

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Alteraciones de la respuesta inmune en pacientes con  
nefropatía IgA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rosa Ana Blasco Porras**

DIRECTOR:

**Jesús Egido de los Rios**

**Madrid, 2015**

TP  
1984  
021

Rosa Ana Blasco Porras



\* 5 3 0 9 8 6 2 9 2 1 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-044214-x

ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON NEFROPATIA IgA

Departamento de Nefrología  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

21/84

© Rosa Ana Blasco Porras  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-1620-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

## **ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON NEFROPATÍA IgA**

Memoria para optar al grado  
de Doctor en Ciencias Quí-  
micas, presentada por:  
ROSA ANA BLASCO PORRAS

DIRECTOR:  
Dr. D. Jesús Egido de los Ríos  
Adjunto del Servicio de Nefrología  
Fundación Jiménez Díaz

PONENTE:  
Dr. D. Angel Martín Municio  
Catedrático de Bioquímica  
Facultad de C. Químicas.

Madrid, Abril 1982



A mis padres.

"



Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Jesús Egido de los Ríos, adjunto del Servicio de Nefrología de esta Fundación.

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. D. Jesús Egido por sus valiosas enseñanzas en el terreno profesional y su contribución a mi preparación humana como investigador.

Así mismo, al Profesor D. Angel Martín Municio, catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, ponente de esta tesis. Sus orientaciones y acertados consejos han sido decisivos para la consolidación del trabajo. También quisiera expresarle mi gratitud por su constante estímulo y apoyo, sin los cuales nunca se hubiese concluido esta tarea.

Al Dr. D. Luis Hernando Avendaño, Jefe del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, por haberme brindado la oportunidad de acceder al mundo científico y manifestarle mi respeto y admiración por su contribución al mejor conocimiento de la patología renal, al permitir el desarrollo y alentar un grupo interdisciplinario de trabajo, cuyos resultados están siendo de gran interés.

A la Dra. Luz Lozano Maneiro, por su amistad y confianza. Su entusiasmo, capacidad de trabajo y colaboración desinteresada han sido fundamentales a la hora de llevar a término esta labor.

A la Dra. Margarita López Trascasa y al Dr. Jaime Sancho López, miembros del Servicio de Nefrología, que me han precedido y abierto camino en el estudio de la nefropatía de IgA.

A las Dras. Pilar Palomino, Clara Eugenia Roda y María de Miguel, miembros del Servicio de Inmunología de esta Fundación, por sus aportaciones inestimables en el terreno inmunológico tanto técnico como teórico.

A Rosario de Nicolás, técnico del Laboratorio de Inmunopatología, por su ayuda y colaboración en la realización de -



A todos los miembros del Laboratorio de Fisiología= Renal del Servicio de Nefrología, por su apoyo moral, afecto y con fianza con los que supieron crear a mi alrededor el ambiente adecuado para superar las dificultades que toda tarea de investigación conlleva.

Y en general, darles las gracias a todos los compañeros que en mayor ó menor medida han contribuido a la realización de este trabajo.

Finalmente quiero dar las gracias a la Fundación -- Conchita Rábago por la concesión de la beca que ha hecho posible= la elaboración de esta tesis doctoral.

#### ABREVIATURAS

CS.-	Componente secretorio
IgA-SC.-	IgA secretoria
IgA-S.-	IgA de superficie
IgM-S.-	IgM de superficie
IgD-S.-	IgD de superficie
IgD-IgM-S.-	IgD e IgM de superficie
IgA p.-	IgA polimérica
IgA m .-	IgA monomérica
IC.-	Inmunocomplejos
IC-IgA.-	Inmunocomplejos de IgA
IC-IgG.-	Inmunocomplejos de IgG
A-IgA.-	Agregados de IgA
A-IgG.-	Agregados de IgG
PWM.-	Mitógeno Pokeweed
Con A.-	Concanavalina A



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

Pág.

1.- <u>INMUNOGLOBULINA A: ASPECTOS BASICOS</u>	
1.1.- <u>Introducción</u>	1
1.2.- <u>Formas moleculares de IgA</u>	1
1.2.1.- IgA monomérica	1
1.2.2.- IgA polimérica	4
1.2.3.- IgA secretoria	6
1.3.- <u>Funcionalidad biológica de la IgA</u>	9
1.3.1.- Activación del sistema del complemento	9
1.3.2.- Transporte a través de las membranas	9
1.3.3.- Otras funciones	11
1.4.- <u>Ciclo hepático de la IgA</u>	11
1.5.- <u>Implicaciones clínicas de la IgA</u>	12
2.- <u>INMUNOCOMPLEJOS EN EL SENO DE LA DISFUNCION INMUNE</u>	14
2.1.- <u>Introducción</u>	14

2.2.- <u>Factores que gobiernan el depósito de inmunocomple-</u> <u>jos en los tejidos</u>	15
2.3.- <u>Mecanismos de inducción de daño tisular</u>	15
3.- <u>RESPUESTA DE IgA: ASPECTOS CELULARES</u>	18
3.1.- <u>Linfocitos</u>	18
3.1.1.- Introducción	18
3.1.2.- Linfocitos T y B: características gene- rales	18
3.1.3.- Criterios de diferenciación	
3.1.4.- Funcionalidad de las células linfoides	24
3.2.- <u>Factores implicados en la respuesta de IgA</u>	27
3.2.1.- Rutas de entrada antigénica e inducción de la respuesta de IgA	27
3.2.2.- Líneas celulares B	28
3.2.3.- Dependencia tímica de la respuesta de IgA	30
3.2.4.- Ciclo celular de la IgA	31
3.2.5.- Importancia biológica del ciclo celular de la IgA	37
4.- <u>LA GLOMERULONEFRITIS MESANGIAL DE IgA: UNA ENFERME-</u> <u>DAD INMUNE</u>	38
4.1.- <u>Introducción</u>	38
4.2.- <u>Característica generales</u>	38
4.3.- <u>El mesangio renal: Modelos inmunopatológicos</u>	40
4.4.- <u>Modelos experimentales de nefropatía de IgA</u>	42
4.5.- <u>Aspectos inmunológicos de la nefropatía de IgA</u>	43
4.5.1.- Inmunoglobulinas séricas y complemento	43
4.5.2.- IgA glomerular	45
4.5.3.- Inmunocomplejos circulantes	46
4.6.- <u>Aspectos inmunogenéticos de la nefropatía de IgA</u>	47

- 4.7.- Glomerulonefritis mesangial de IgA asociada al síndrome de Schönleichen Henoch y a las hepatopatías alcohólicas

## OBJETIVOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- <u>Materiales</u>	52
3.1.1.- Pacientes	52
3.1.2.- Reactivos y componentes especiales	52
3.1.3.- Aparatos	53
3.1.4.- Soluciones más utilizadas	54
3.2.- <u>Métodos</u>	55
3.2.A.- <u>Técnicas inmunoquímicas</u>	55
3.2.A.1.- Aislamiento de IgG	55
3.2.A.2.- Aislamiento de IgM	56
3.2.A.3.- Aislamiento de IgA	56
3.2.A.4.- Inmunodifusión doble bidimensional	57
3.2.A.5.- Inmunoelectroforesis	58
3.2.A.6.- Aislamiento de IgG de conejo	59
3.2.A.7.- Obtención del suero de carnero anti-IgG de conejo	59
3.2.A.8.- Marcaje de proteínas	59
3.2.A.9.- Purificación de proteínas marcadas	60
3.2.A.10.- Preparación de inmunoabsorbentes	61
3.2.A.11.- Obtención del componente secretorio libre	62
3.2.A.12.- Ultracentrifugación en gradiente de densidad	63
3.2.B.- <u>Cuantificación de inmunoglobulinas por ra-</u>	

<u>radioinmunoanálisis</u> (RIA)	64
3.2.B.1.- Obtención del antígeno	64
3.2.B.2.- Marcaje de inmunoglobulinas con $^{125}\text{I}$	64
3.2.B.3.- Adsorción del suero de carnero y del conejo frente a suero humano total	65
3.2.B.4.- Titulación del suero de carnero anti-IgG de conejo	65
3.2.B.5.- Valoración del primer anticuerpo	66
3.2.B.6.- Potencia del suero de carnero - anti-IgG de conejo	66
3.2.B.7.- Realización del ensayo	67
3.2.B.8.- Análisis de variables	68
3.2.C.- <u>Cultivo de células mononucleares in vitro</u>	68
3.2.C <sub>1</sub> .- <u>Preparación de linfocitos para su cultivo "in vitro"</u>	68
- Obtención de linfocitos	68
- Viabilidad celular	69
- Preparación de hematíes de carnero	69
- Preparación del suero del suero de ternera fetal adsorbido	70
- Formación de rosetas espontáneas	70
- Aislamiento de poblaciones enriquecidas en células T y B	70
- Inmunoglobulinas de superficie	71
- Rendimiento de la técnica	71
3.2.C <sub>2</sub> .- <u>Síntesis de inmunoglobulinas y células implicadas</u>	72
- Síntesis de inmunoglobulinas	72
- Formas moleculares de IgA producidas in vitro	73
- Caracterización bioquímica de la	

IgA producida in vitro	73
- Receptores celulares para el componente secretorio	74
- Síntesis de inmunoglobulinas en presencia de suero anti-cadena J humana	76
- Detección de cadena J en el citoplasma de linfocitos cultivados in vitro	77
3.2.C <sub>3</sub> .- <u>Factores implicados en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas - "in vitro"</u>	78
3.2.C <sub>3a</sub> .- <u>Factores celulares</u>	78
- Generación de células supresoras mediante la activación de la Con A	78
- Cultivo mixto de células mononucleares "in vitro"	78
- Co-cultivo de poblaciones de linfocitos enriquecidos en células T y B	79
- Cuantificación de células T reguladoras de la síntesis de inmunoglobulinas in vitro, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales	80
3.2.C <sub>3b</sub> .- <u>Factores séricos</u>	81
- Efecto del suero de los pacientes con nefropatía de IgA sobre la síntesis de inmunoglobulinas in vitro	81
- Efecto del suero de los pacientes con nefropatía de IgA sobre la generación de células supresoras en cultivo	81
- Efecto de los agregados de IgA monomérica, IgA polimérica e IgG, sobre la síntesis y la actividad de células supresoras en cultivo	82

## RESULTADOS



4.1.-	<u>Síntesis de inmunoglobulinas "in vitro"</u>	
4.1.A.-	<u>Estudio de la síntesis de inmunoglobulinas por las células mononucleares de sangre periférica</u>	84
4.1.B.-	<u>Estudio de las características bioquímicas de la IgA producida en cultivo</u>	84
4.1.B.1.-	Formas moleculares producidas - in vitro.	84
4.1.B.1.-	Caracterización bioquímica de - las formas moleculares	85
4.1.C.-	<u>Análisis de los receptores celulares para el componente secretorio en linfocitos estimulados con PWM</u>	88
4.1.C.1.-	Inmunoglobulinas de superficie y receptores para el componente secretorio	90
4.1.C.2.-	Receptores citoplasmáticos para el componente secretorio	92
4.1.D.-	<u>Formación de cadena J y presencia en el citoplasma celular</u>	92
4.1.E.-	<u>Bloqueo de la síntesis de inmunoglobulinas inducida por el PWM, en presencia de un suero heterólogo anti-cadena J humana</u>	101
4.2.-	<u>Factores implicados en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas "in vitro"</u>	105
4.2.A.	<u>Factores celulares</u>	105
4.2.A.1.-	Generación de células supresoras inducidas por la Con A	105
4.2.A.2.-	Cultivo mixto de linfocitos	108
4.2.A.3.-	Análisis de las poblaciones de células T reguladoras, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales	112
4.2.A.4.-	Estudio de la actividad de células T cooperadoras de la síntesis	

de IgA	121
4.2.B.- <u>Factores séricos</u>	123
4.2.B.1.- Efecto del suero de pacientes con nefropatía de IgA, sobre la síntesis de inmunoglobulinas en individuos control	125
4.2.B.2.- Niveles de células T reguladoras de la síntesis de inmunoglobulinas en cultivos control pretratados con el suero de pacientes con nefropatía de IgA	125
4.2.B.3.- Modificación de la actividad y - generación de células supresoras inducidas por la Con A en presencia del suero de pacientes con - nefropatía de IgA	128
4.2.B.4.- Efecto de la IgA monomérica, IgA polimérica e IgG, así como de sus agregados proteicos, sobre la síntesis de inmunoglobulinas	132
4.3.- <u>Estudio de las alteraciones celulares en familiares - próximos a los pacientes con nefropatía de IgA</u>	135
4.3.A.- <u>Niveles séricos de inmunoglobulinas</u>	139
4.3.B.- <u>Producción de inmunoglobulinas "in vitro" tras estimulación con PWM</u>	139
4.3.C.- <u>Distribución de las formas moleculares de IgA en familiares de pacientes con nefropatía de IgA</u>	142
4.3.C.1.- Porcentaje de formas moleculares de IgA en el suero de familiares de pacientes con nefropatía de - IgA	142
4.3.C.2.- Formas moleculares de IgA en el sobrenadante de cultivos celulares estimulados con PWM	142

4.3.D.- <u>Análisis de receptores celulares para el componente secretorio e inmunoglobulinas= de superficie</u>	145
4.3.D.1.- Receptores citoplasmáticos pa- ra el componente secretorio	145
4.3.D.2.- Inmunoglobulinas de superficie	148
4.3.E.- <u>Actividad supresora inducida por la Con A en los familiares de pacientes con nefro- patía de IgA</u>	148
4.3.F.- <u>Cuantificación de poblaciones de células T reguladoras de síntesis de inmunoglobu- linas in vitro.</u>	151

<b>DISCUSIÓN</b>	155
------------------	-----

<b>CONCLUSIONES</b>	173
---------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	176
---------------------	-----

# INTRO- DUCCIÓN



## INTRODUCCION

### 1.- Inmunoglobulina A: aspectos básicos

#### 1.1.- Introducción

La IgA representa una sexta parte de las inmunoglobulinas séricas. Pertenece a la fracción de Y-globulinas del suero, con una migración electroforética que la clasifica dentro de las  $\beta_{2A}$ -globulinas.

La IgA sérica esta constituida por varias formas moleculares: monómeros, dímeros y polímeros. En el hombre, la proporción de IgA monomérica es muy alta, representando sólo un 10% - los dímeros y oligómeros. En otras especies animales la forma predominante es la IgA dimérica (172).

En 1963, Tomassi descubrió la participación de la IgA en las secreciones humanas. La proteína es dimérica y difiere del modelo sérico en una estructura específica adicional, denominada componente secretorio (CS) (164).

En 1970, Kolparn y Koshland determinaron la existencia de otro componente estructural en todas las formas poliméricas incluida La IgA secretoria, denominado cadena J.

A pesar de la gran cantidad de datos aportados en los últimos años es muy difícil proponer un modelo coherente para esta inmunoglobulina que justifique alguna de sus propiedades y su importancia funcional en el organismo.

#### 1.2.- Formas moleculares de IgA

##### 1.2.1.- IgA monomérica

Esta constituida por una unidad simple integrada por dos cadenas pesadas tipo  $\alpha$  y dos cadenas ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes. Su peso molecular es de 160.000 D. Migra electroforéticamente en la zona de las  $\beta_{2A}$ -globulinas y su coeficiente de extinción es de 1.34. Ca-

rece de estructural helicoidal y tiene forma de Y aplanada, según indican los estudios de microscopía electrónica. Tiene una elevada carga negativa debido al bajo contenido en lisina y la alta proporción de cisteína, cuya funcionalidad no está del todo aclarada. Aparte de los residuos que definen los dominios de homología y del que participa en la unión entre cadenas pesadas y ligeras en el caso de  $IgA_1$ , se forman dos puentes disulfuro en la región "rotula" que estabilizan la estructura y le confieren resistencia a la acción proteolítica. El resto se cree implicado en la formación de puentes disulfuro específicos de la  $IgA$  y en la regulación del proceso de polimerización (Fig. 1).

El peso molecular de la cadena  $\alpha$  es de 57.000 D. Migra electroforéticamente entre las cadenas pesadas de la  $IgG$  e  $IgM$ . Tiene una gran homología con las cadenas  $\gamma$  y  $\mu$  en la secuencia de aminoácidos distribuida a lo largo de la región  $F_c$ . Esto hace pensar en una evolución independiente de los dominios de la cadena pesada, a través de una línea de descendencia común donde una cadena pesada sería antecesora de otra.

Desde un punto de vista químico y antigénico se pueden distinguir dos clases de  $IgA$ :  $IgA_1$  e  $IgA_2$ . La  $IgA_2$  presenta dos alotipos:  $A2m(1)$  y  $A2m(2)$ , que se diferencian por la falta de uniones covalentes entre las cadenas pesadas y ligeras, permaneciendo las cadenas ligeras unidas entre sí (Fig. 4).

Aproximadamente el 90% de la  $IgA$  sérica es  $IgA_1$ , mientras que la proporción entre  $IgA_1$  e  $IgA_2$  se iguala en las secreciones (171). Químicamente, las mayores diferencias entre  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  aparecen en la región "rotula" y en el número y tipo de los oligosacáridos que forman parte de su estructura (168). La detección y sustitución de una secuencia de aminoácidos por otra en la cadena  $\alpha_2$  afecta la conformación de la molécula. La región "rotula" no puede contraerse normalmente y se pierden las señales alostéricas necesarias para la activación del complemento por la vía clásica. Sólo la región  $F_c$  de la  $IgA_1$  posee esta propiedad biológica.

El contenido en hidratos de carbono de la  $IgA_1$  e  $IgA_2$  es variable. Se disponen en posiciones homólogas entre los

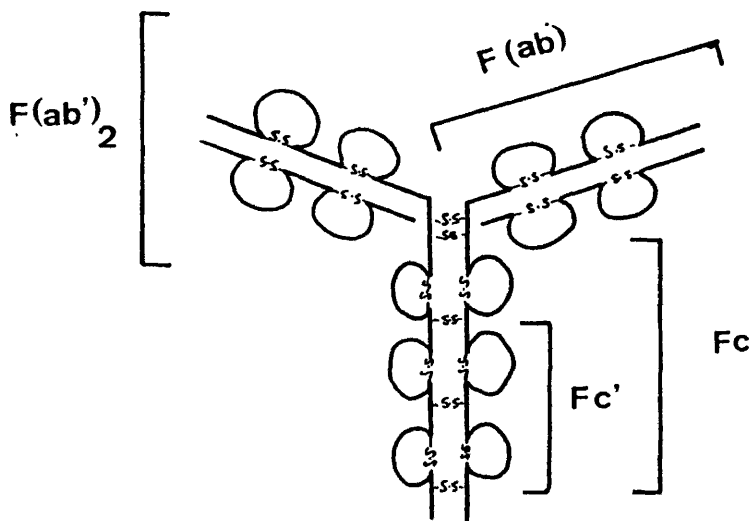


Fig. 1.- Esquema general de la Inmunoglobulina A

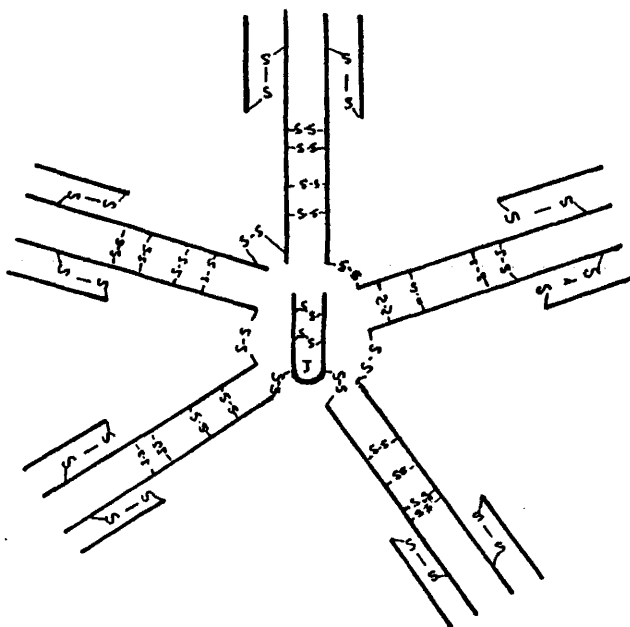


Fig. 2.- Esquema general de un polímero de IgM.



dominios compactos de las cadenas pesadas y en su superficie. -- Son restos de N-Acetil Glucosamina y N-Acetil Galactosamina, este último propio de la IgA<sub>1</sub>, cuya distribución depende del tipo de cadena y el alotipo implicado. Incrementan la solubilidad de la molécula y favorecen su secreción.

La existencia de 18 restos de aminoácidos en la región C-terminal de la cadena  $\alpha$ , en relación a los otros tipos de cadenas pesadas, le permite establecer un cuarto dominio de homología. Su importancia funcional es enorme ya que el potencial para pasar de estructura en  $\alpha$ -hélice a estructura  $\beta$  en la formación del dominio, esta relacionada con la unión de la cadena J y su papel en el proceso de polimerización.

#### 1.2.2.- IgA polimérica

La IgA polimérica representa aproximadamente un 20% de la IgA sérica circulante. Aparece como dímeros, trímeros= de coeficiente de sedimentación (9-13)S y formas moleculares de mayor tamaño.

Por micrografía electrónica se observa que la asociación entre unidades para la formación de estas moléculas se realiza a través de la región Fc (Fig. 3). En los polímeros de alto peso molecular, las unidades se disponen circularmente alrededor de un eje, de forma análoga a la molécula de IgM (Fig. 2). Las uniones entre los Fc adyacentes son rígidas y la movilidad es aportada por las disposiciones características de las regiones Fc y F(ab')<sub>2</sub> en la región de la "rótula".

La IgA polimérica contiene un pequeño polipéptido estructural denominado cadena J (109), que juega un importante papel en la polimerización (19).

La cadena J tiene un peso molecular de 16.000 D. - Presenta un gran número de residuos ácidos: prolina y cisteína - que le confieren unas propiedades conformacionales muy características. Esta unida covalentemente a dos de las cadenas  $\alpha$ , mediante puentes disulfuro establecidos con los residuos de cisteína de la región C-terminal. Las demás cadenas están unidas entre

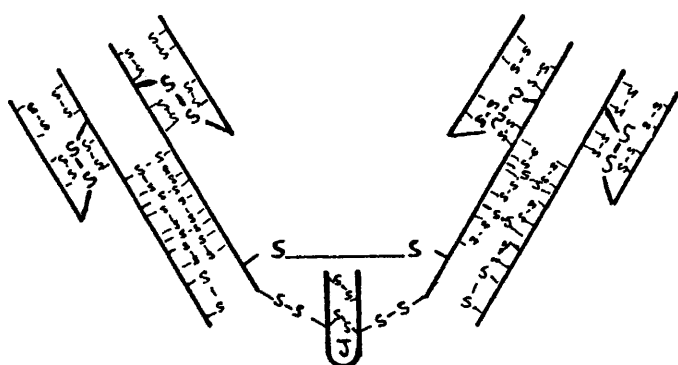


Fig. 3.- Esquema general de una IgA dimérica

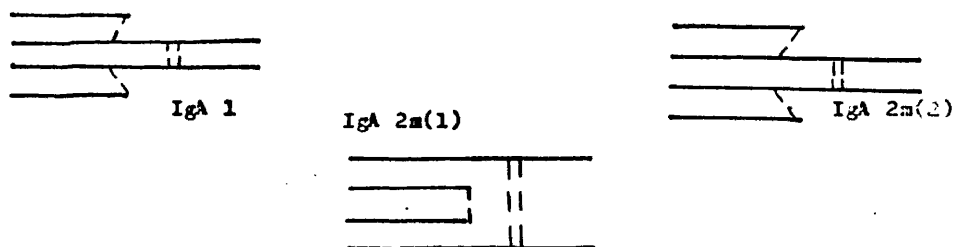


Fig. 4.- Clases de IgA monomérica

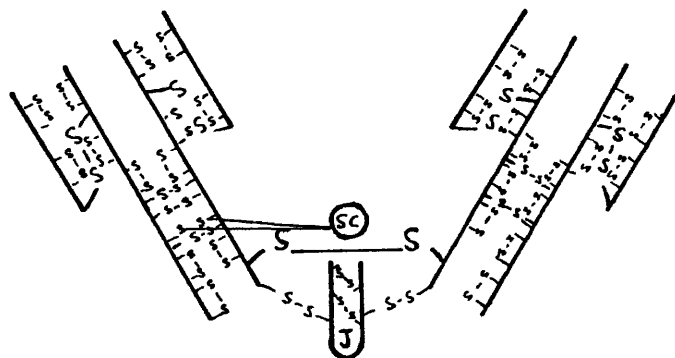


Fig. 5.- Esquema general de una Ig<sup>a</sup> secretoria.

sí, sin interaccionar con la cadena J (134). La unión es variable. Cualquiera de las cadenas  $\kappa$  de las subunidades integrantes podría establecerla (108). Ocupa una posición oculta en la molécula y no es accesible antígenicamente.

El papel jugado por la cadena J en la polimerización aún no ha sido aclarado. Se sintetiza por las células productoras de IgA y su incorporación es concomitante con la formación de polímeros (96). El proceso es el resultado de la actividad de una enzima intercambiadora de puentes disulfuro que actúa al azar. Esta actividad podría ser el factor regulador del proceso.

Los primeros trabajos en este sentido sugerían la necesidad de una incorporación de la cadena J en el monómero, - previa a su secreción en el medio extracelular. El grado de polimerización del monómero vendría dado por los niveles intracelulares de cadena J.

En 1974 Imman ya apuntó la posibilidad de que la cadena J sólo contribuyera a la estabilización de los polímeros, pero no fuera necesaria para su formación. Los estudios posteriores in vitro con la IgM, de características estructurales análogas a las de IgA, confirmaron este punto. La influencia del polipéptido se ejercía a nivel del ensamblaje de las cadenas y en consecuencia en la estabilidad conformacional de la molécula (8).

La cadena J no sólo proporciona multivalencia al polímero de IgA, sino que le confiere un centro básico de estabilidad frente a los agentes reductores propios del medio externo donde desarrolla su papel principal. Es de vital importancia para su transporte y funcionalidad como anticuerpo en las secreciones externas, ya que sin su presencia no puede realizarse la unión estable del componente secretorio al dímero de IgA (20). - Esto explicaría la conservación filogenética de esta molécula a lo largo de millones de años (172) y el hecho de que la mayor parte de las inmunoglobulinas en las secreciones y en el suero de animales inferiores sea IgA dimerica (166).

#### 1.2.3.- IgA secretoria

La IgA eliminada en las secreciones externas ó -- IgA secretoria (IgA-CS) tiene un coeficiente de sedimentación de 11 S y un peso molecular de 400.000 D. Su estructura es dimérica análoga a la de la IgA dimérica sérica. Lleva unida una glicoproteína denominada componente secretorio (CS), cuyo peso molecular es de 71.000 D (66) y su composición aminoácídica totalmente diferente de la de la cadena  $\alpha$  y J. Su contenido en glicina y su carencia de metionina le proporcionan una movilidad electroforética en la zona más alejada de las  $\beta$ -globulinas.

El CS está unido por dos puentes disulfuro a una de las dos subunidades de IgA (Fig. 5), actuando como barrera protectora de la acción proteolítica que acompaña a las secreciones externas. Hay algunas evidencias a favor de la existencia de dos formas moleculares distintas para el CS: una libre y otra unida a la IgA (170, 55).

El CS juega un papel fundamental en el transporte de la IgA a través de los epitelios exocrinos. Se sintetiza por las células columnares del epitelio intestinal (122, 20, 29). El tratamiento previo de la IgA dimérica con CS libre, ó bien de las células epiteliales con suero anti-CS, bloquea la interacción. Esto se correlaciona con la diferente capacidad de unión del CS en solución, a las formas monoméricas y poliméricas (121)

El complejo formado entre la IgA sintetizada localmente por las células plasmáticas de la lámina intestinal y el CS de la superficie basolateral de las células epiteliales, se internaliza en la célula epitelial por un proceso de pinocitosis y es transportado a través de un sistema de vesículas intracelulares hasta liberarse entre las microvellosidades intestinales (122). Este mecanismo puede considerarse válido para todos los procesos exocrinos, en los que está implicada la IgA.

El punto de ensamblaje entre las moléculas no se conoce. La IgA-CS aparece como tal, al alcanzar las vesículas el citoplasma apical (18). El proceso está asociado a la actividad de una enzima intercambiadora de puentes disulfuro que aparece en la mayoría de las membranas de órganos y tejidos (65). Esta enzima es capaz de regular in vitro la asociación covalente en--

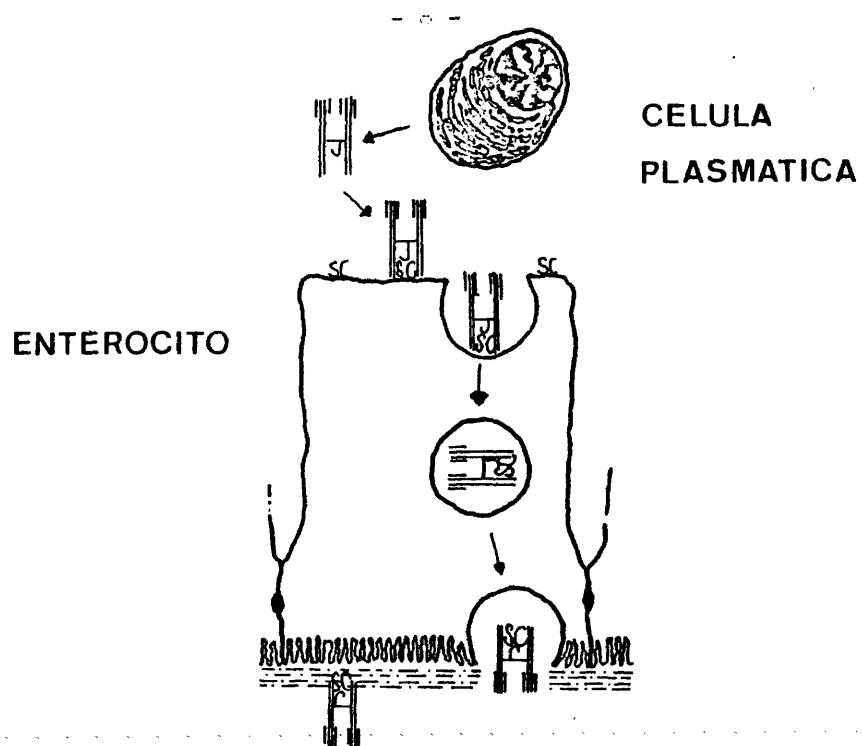


Fig. 6.- Esquema del transporte de IgA a través del enterocito.

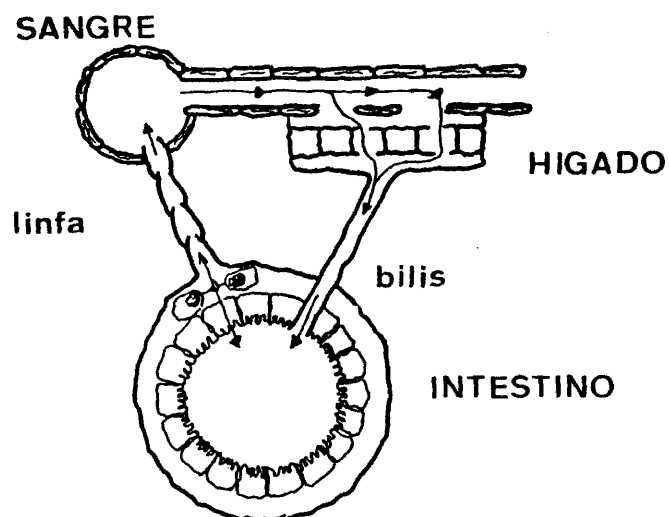


Fig. 7.- Vía de acceso de la IgA al intestino.

tre el CS y la IgA dimérica (121) y es responsable del intercambio de puentes disulfuro necesario para la unión estable (Fig.6)

Es necesario destacar el hecho de que aún no se sabe, si el CS que sirve como receptor y mediador del transporte de la IgA a través de la célula, es el mismo que aparece unido a la molécula en el fluido intestinal. Algunos autores suponen un proceso de recombinación en el momento de la liberación con el CS libre en la luz intestinal (52).

### 1.3.- Funcionalidad biológica de la IgA

Las propiedades biológicas ó funciones secundarias de un anticuerpo son aquellas que estan mediadas por la región - Fc de la molécula (111). Se manifiestan con independencia del antígeno por su unión directa a la superficie celular ó tras la interacción del  $F(ab')_2$  con el antígeno.

#### 1.3.1.- Activación del sistema del complemento

Se ha comprobado en diversos experimentos in vitro, que los agregados por el calor de IgA, ya sea del tipo 1 ó del 2 (61), los inmunocomplejos (IC) en los que participa esta inmunoglobulina y la propia IgA polimérica (45) son capaces de activar la vía alterna del sistema del complemento.

In vivo, los datos no son tan concluyentes. Las condiciones naturales en el tracto gastrointestinal no afectan en principio las funciones del sistema inmune. Es muy posible, que el CS unido a la IgA induzca propiedades biológicas diferentes por el simple bloqueo físico de porciones críticas de la molécula y sea el responsable de la falta de coherencia de los resultados obtenidos hasta el momento.

#### 1.3.2.- Transporte a través de las membranas protectoras

El máximo significado biológico de la IgA se manifiesta en las secreciones externas. Ejerce una barrera protec

tecnica en la superficie donde el contacto antigénico es masivo y continuo. Se ha apuntado incluso, que al igual que la IgA materna permanece en el intestino del lactante sin absorberse (137), los anticuerpos de IgA en la edad adulta permanecen covalentemente unidos a las microvellosidades de las células intestinales formando una verdadera cubierta protectora del intestino (122).- Parece ser, que la simple combinación con el antígeno es suficiente para impedir el ataque a la célula epitelial, paso necesario para su penetración en el organismo. De hecho, la deficiencia selectiva de IgA va acompañada de la presencia de anticuerpos de la clase IgM frente a antígenos circulantes procedentes del tracto gastrointestinal (31).

El tamaño y la razón antígeno/anticuerpo de los inmunocomplejos formados son factores decisivos de su destino y capacidad de protección. La naturaleza dimérica de la IgA-CS y su alta proporción en la luz intestinal favorece la formación de inmunocomplejos relativamente grandes fácilmente atrapables por las secreciones de mucus, en cuya activación juegan un importante papel (94).

La formación de inmunocomplejos a partir de moléculas no bien digeridas favorece un exceso antigénico capaz de extravasar la barrera intestinal, constituyendo uno de los principales mecanismos de inducción de tolerancia a antígenos locales. En el caso de microorganismos y toxinas bacterianas, la IgA-CS mitiga la invasión estableciendo reacciones cruzadas y formando grandes inmunocomplejos que se eliminan por medios no inmunológicos del intestino. (169).

La degradación proteolítica de la molécula de IgA por la IgA proteasa colabora en la acción protectora. Los fragmentos  $F(ab')_2$  tienen como objeto la aglutinación del antígeno y la formación de anticuerpos bloqueantes (138). Este hecho contribuye a explicar el aumento en la proporción de IgA<sub>2</sub> en las secreciones externas. La IgA proteasa sintetizada por algunos microorganismos de la flora intestinal, es específica para la IgA<sub>1</sub> sérica y secretora (55). Puede considerarse una adaptación del hombre frente a la bacteria. Se ha observado que la neiseria patógena

na sintetiza IgA proteasa y la no patógena, no (138).

Quizás el papel más interesante, dada su importancia en la perpetuación de las especies, sea el desarrollado por la IgA en la leche materna. Los anticuerpos de IgA se sintetizan en la glándula mamaria por células plasmáticas procedentes del tracto gastrointestinal (176,177). Le proporcionan al intestino del recién nacido una defensa primaria frente a agentes potencialmente patógenos ó endémicos, hasta que consigue poner en marcha su propio sistema inmune. En roedores y otros animales, hay variaciones en la cantidad y clase de inmunoglobulina absorbida -- por el intestino, pero en general la IgA materna nunca alcanza la circulación (24).

#### 1.3.3.- Otras funciones

La IgA agregada y no agregada en un medio sin suero es capaz de unirse y reaccionar con los neutrofilos, estimulando la adherencia, fagocitosis y liberación de enzimas lisosomales potenciando el poder bactericida de esta inmunoglobulina

La IgA polimérica es capaz de inhibir la quimiotaxis de polimorfonucleares normales, siendo la única función realizada por el Fc de los inmunocomplejos ventajosa para el huésped. Previamente (174), se descubrió en pacientes con cirrosis -- alcohólica, la presencia de inhibidores de la quimiotaxis leucocitaria asociados a la IgA. La movilidad electroforética de los inhibidores era compatible con la de esta inmunoglobulina. La actividad inhibidora apareció de forma paralela al incremento de la concentración sérica de IgA. Los mismos autores demostraron -- que la presencia de la paraproteína de IgA inhibía la quimiotaxis por otros mecanismos aún no aclarados (173). La actividad inhibitoria era mayor para la forma polimérica de la región (10-14 S) y es posible que este relacionada con la degranulación de la célula posterior a la interacción.

#### 1.4.- Ciclo hepático de la IgA



Recientemente se ha descrito la participación del hígado en la eliminación de la IgA polimérica del suero. La ruta hepática constituye un mecanismo de refuerzo en el aporte de IgA como anticuerpo al intestino (Fig. 7). La IgA eliminada proviene de las células plasmáticas intestinales y es transportada a la bilis en contra de un gradiente de concentración (66, 130). El mecanismo es análogo al del enterocito y la IgA liberada está unida al CS (Fig. 6).

En animales de experimentación, el CS aparece sobre la superficie de los hepatocitos y actúa como receptor en la membrana (132, 158) para la IgA polimérica. El complejo se internaliza y transporta a través del citoplasma mediante pequeñas vesículas que se liberan en los canalículos biliares (66).

En el hombre, el mecanismo aún no está aclarado. Se ha detectado CS e IgA sobre la superficie de las células epiteliales biliares (76), pero no ha podido determinarse el origen de esta inmunoglobulina. La IgA epitelial puede provenir lo mismo del suero que de las células plasmáticas localizadas en la zona. La localización de IgA sobre la superficie del hepatocito (76) y su distribución en el 50% de las células, de forma análoga a la observada para el CS (163) en este órgano, apoya la idea de que el CS sea también en el hombre el receptor y mediador de la transferencia de IgA a los espacios biliares.

Es muy posible que el hígado, capaz de transportar proteínas séricas e incluso IgG e IgM en muy baja proporción, desarrolle un papel controlador de las concentraciones de estas moléculas en el suero. De hecho, la obstrucción biliar, cirrosis y todas las hepatopatías que suponen un daño extenso de la función hepática, van acompañadas de una elevación en las concentraciones séricas de IgA y CS (163).

#### 1.5.- Implicaciones clínicas de la IgA

A parte del posible papel patogénico que pueda desarrollar en la nefropatía de IgA, la IgA participa en muchos trastornos inmunológicos, ya sea por aumento ó defecto de su sín-

tesis. El trastorno puede ser causa directa del desarrollo de la enfermedad ó secundaria a un desorden establecido.

La hiperproducción policlonal secundaria de IgA es ta asociada siempre a una estimulación antigénica, conocida ó no de la mucosa. Así, aparece asociada a ciertas condiciones infla- matorias e infecciones urinarias agudas, cólera asiático ó infec- ciones bronquiales de distinto origen.

En enfermedades hepáticas se producen algunos he- chos de cierta consideración. La IgA sérica se eleva cuatro ve- ces por encima de su valor normal y su proporción se altera con- respecto a la de IgG e IgM en todos los procesos crónicos (52).= Curiosamente, una alta proporción de la IgA es polimérica (165)= y su concentración en el conducto torácico linfoide es incluso - mayor que en el suero (157) Además, se ha observado la acumula- ción de una importante población de células con IgA en el teji- do portal peritubular y conectivo septal (64).

En los mielomas se produce un aumento del nivel de- IgA 10 ó 15 veces por encima del valor normal. La hiperproduc- ción va acompañada de una alteración en la relación polímero/me- nómero a favor del polímero. La proporción de polímeros varía -- con el tipo de mieloma, observándose una serie de funciones bio- lógicas de las que carece la forma monomérica: mayor capacidad - de paso a través de la barrera epitelial gracias a su capacidad= para interaccionar con el CS (19), formación de complejos con al- gunas proteínas séricas (56), e interacción con neutrófilos y en consecuencia favorecimiento de la liberación de enzimas lisosoma- les y citoplasmáticas. Por último, en este caso la afinidad por= el antígeno es mayor.

La enfermedad de cadenas  $\alpha$  es la más importante,= dentro del grupo de las producidas por un incremento monoclonal= de la IgA. Es debida a un aumento en la síntesis de cadenas pesa- das. Se caracteriza por un desorden proliferativo de células B a nivel primario en el intestino delgado y nódulos mesentéricos.= Esto tiene como consecuencia la síntesis de cadena  $\alpha$  sin cade- nas ligeras, no formando la molécula de inmunoglobulina tal como se conoce. Las cadenas tienen tendencia a polimerizarse en diver

tos tamaños, conteniendo en todos los casos cadena J. Dado que los grupos étnicos afectados pertenecen al área mediterránea, más que una enfermedad de origen genético, se considera una consecuencia de una estimulación antigénica determinada, quizás por microorganismos intestinales.

El déficit selectivo de IgA es un hecho muy generalizado con una frecuencia del 1/500. En muchos casos, aparece a lo largo del desarrollo y va acompañado de trastornos intestinales y pulmonares, haciendo pensar en un déficit de IgA secretoria. Va acompañado de un aumento local de IgM e IgG (20), siendo elemento de diagnóstico en individuos aparentemente normales y deficientes en IgA (129).

## 2.- Inmunocomplejos en el seno de la disfunción inmune

### 2.1.- Introducción

La presencia de complejos de antígeno y anticuerpo sobre los tejidos es responsable de gran cantidad de enfermedades humanas, debido a su capacidad para inducir los mecanismos de inflamación. Algunos ejemplos son: Lupus Eritematoso Sistémico, nefropatía de IgA, glomerulonefritis aguda y crónica, artritis reumatoide, vasculitis, arteritis y los daños tisulares asociados a una amplia gama de agentes infecciosos. En todos los casos, el mecanismo por el cual se depositan ó forman en los tejidos afectados depende de la localización del antígeno. Si se trata de un antígeno estructural ó celular fijo, el anticuerpo difundirá desde el compartimento vascular y el inmunocomplejo se formará en el órgano donde se localiza el estímulo. Ahora bien, si se trata de un antígeno secretado soluble circulante, los inmunocomplejos se formarán en la circulación y luego se depositarán en el tejido. En estas condiciones, no hay relación entre el antígeno y la localización del daño tisular y los inmunocomplejos se depositarán preferentemente en órganos con vascularización especializada como riñones, arterias, piel, pulmones y plexos coroideos.

## 2.2.- Factores que gobiernan el depósito de inmunocomplejos en los tejidos

Los inmunocomplejos están constituidos por una ó varias moléculas de antígeno con una ó varias moléculas de anticuerpo. Su tamaño y concentración van a determinar su localización sobre la membrana basal de un órgano particular y la activación de los sistemas mediadores humorales y celulares responsables del daño tisular.

El tamaño de la matriz tridimensional que constituye el complejo depende en su mayor parte de la concentración de moléculas de antígeno y anticuerpo y de la afinidad de este último por el primero. En animales de experimentación, los inmunocomplejos de tamaño intermedio son responsables en su mayoría del daño tisular. Los grandes inmunocomplejos son insolubles y rápidamente eliminados de la circulación por el sistema reticuloendotelial. Los pequeños inmunocomplejos no activan los sistemas mediadores y pueden circular libremente durante largo tiempo.

En condiciones experimentales, la enfermedad progresiva no se desarrollaría en animales con una muy grande ó muy pequeña respuesta de anticuerpos a un estímulo antigénico permanente. En animales con una respuesta intermedia de anticuerpos puede desarrollarse la glomerulonefritis de diverso tipo histológico (membranosa ó proliferativa) con una misma dosis antigénica y afectar los pulmones con un pequeño incremento en el estímulo. Estas diferencias en la respuesta individual que conducen a síndromes clínicos distintos a partir del mismo estímulo antigénico están determinadas genéticamente.

## 2.3.- Mecanismos de inducción del daño tisular

Una vez que los inmunocomplejos circulantes se han depositado en un tejido es necesario un incremento en la permeabilidad de los vasos para iniciar el daño tisular.

En conejos, cuando los basófilos sensibilizados -- transportando IgE en su superficie interaccionan con el antígeno

liberan sus constituyentes granulares. La histamina y el factor= activante de las plaquetas ó PAF inducen la agrupación y desgr= anulación de las plaquetas y la liberación de serotonina e hista= mina plaquetaria. En el torrente sanguíneo se desarrolla una --- reacción alérgica que conduce al depósito de los inmunocomple= jos circulantes en la pared del vaso. Este proceso va acompañado de la la activación del sistema del complemento. La liberación - de anafilotoxinas C5a y C3a, que actúan sobre basófilos y mastoci= tos liberando aminas vasoactivas y otras sustancias, contribuye a aumentar la permeabilidad de los vasos y el acúmulo de inmunocom= plejos en la membrana basal vascular.

Los inmunocomplejos activan multitud de sistemas me= diadores a través de la porción Fc de la molécula de inmunoglobu= lina. Con la excepción de los eritrocitos, todas las células cir= culantes tienen receptores para la porción Fc de las inmunoglobu= linas. Su interacción altera su función específica. De esta for= ma, todas las células de la serie mielóide y los mismos macrófa= gos pueden activarse y liberar sus constituyentes granulares. -- Los linfocitos B pueden ser bloqueados y los T estimulados para - producir factores supresores ó cooperadores, capaces de modular= la respuesta inmune.

La región Fc de los inmunocomplejos también activa la vía clásica del complemento. Su interacción con el C1 inicia= una secuencia de sucesos que conduce a la excisión proteolítica= limitada del C3 y C5 y liberación de las anafilotoxinas. El C5a= es un poderoso agente quimiotáctico y el C3a tiene la propiedad= de facilitar la adherencia celular, favoreciendo la fagocitosis= por un lado y la activación celular por otro. Ambos, degranulan= basófilos y mastocitos aportando histamina y otras sustancias -- anafilotóxicas.

El segundo gran sistema mediador humoral es el del factor de Hageman. No se activa por los inmunocomplejos, sino de forma indirecta durante el desarrollo de la inflamación.

Uno de los mecanismos más importantes de inducción del daño tisular es el mediado por el complemento y los neutrófi= los. Experimentalmente se ha estudiado mediante la reacción de -

Arthus, por inyección local de un antígeno a un animal con anticuerpos circulantes. El antígeno y el anticuerpo difunden juntos y forman complejos en los vasos sanguíneos. El complejo fija el complemento con una acumulación focal de neutrófilos en un periodo de dos a tres horas. Se produce una destrucción asociada de la membrana basal estructural de los vasos, especialmente de las venas, que permite el paso de células al espacio extravascular con el consiguiente edema y hemorragia. La reacción alcanza un pico máximo a las 12 horas de la inyección y luego decae lentamente. En las 24 y 48 horas siguientes, los neutrófilos se reemplazan gradualmente por células mononucleares.

Tanto los neutrófilos como el complemento son participantes obligados de esta reacción y su eliminación del medio previene el daño tisular. La eliminación del complemento evita la acumulación de neutrófilos, pero la eliminación de estos no evita la fijación del complemento a los inmunocomplejos. Es decir, el complemento es el factor que media la agrupación de los neutrófilos.

El factor quimiotáctico C5a atrae estas células a la zona de depósito de los inmunocomplejos y junto con el C3a y el Fc del complejo, activa su función fagocítica. La fagocitosis produce radicales libres, péptidos vasodilatadores y sustancias quimiotácticas. Su puesta en contacto con los macrófagos induce la liberación de su contenido granular, constituido por potentes enzimas capaces de actuar en microambientes ácidos y neutros. La proteasa neutra incluye collagenasa, elastasa y una actividad enzimática semejante a la de la quimotripsina. El medio inflamatorio contiene una gran variedad de sustancias: quininógeno, plasminógeno, proteínas de la coagulación, del complemento, elastina, colágeno, etc.; capaces de inducir la actividad de estas enzimas y la degradación proteolítica. Por ejemplo: en la nefritis nefrotóxica inducida experimentalmente, la invasión de los neutrófilos destruye la membrana basal que aparece en fragmentos en la crina. Un mecanismo similar opera en la sinovitis experimental, en la arteritis necronizante de la enfermedad del suero y en el comienzo de los hechos histológicos que acompañan a la GN estreptocócica y el

rechazo de injertos en el hombre.

Recientemente se ha demostrado un mecanismo independiente del neutrófilo y del complemento en el desarrollo de la glomerulonefritis experimental de la enfermedad del suero y en la enfermedad inmunológica pulmonar humana. El macrófago atraído por factores quimiotácticos de forma análoga a la del neutrófilo, parece ser el mediador de esta lesión. La presencia en el exudado inflamatorio del factor de crecimiento de los macrófagos contribuye a su proliferación en la zona afectada.

Los inmunocomplejos circulantes se han determinado en una amplia variedad de enfermedades humanas. Sin embargo, es muy importante tener presente que en enfermedades como la glomerulonefritis crónica, cuyo origen probablemente sean los complejos, no son detectados circulando en el suero. En otras enfermedades, donde los inmunocomplejos no parecen estar involucrados en la patogénesis pueden medirse perfectamente en la circulación. La mera detección de inmunocomplejos no necesariamente implica participación en la patogénesis de la enfermedad, pero dada su capacidad para inducir la inflamación, alerta a cerca de la posible evidencia de sus efectos flogogénicos. (180).

### 3.- Respuesta de IgA: aspectos celulares

#### 3.1.-- Linfocitos

##### 3.1.1.- Introducción

El conjunto de estructuras orgánicas que desarrollan la función inmunológica se denomina sistema inmune. Cuando funciona adecuadamente sus componentes integrados proporcionan una respuesta general de protección al organismo frente a cualquier tipo de agente patógeno.

Esta constituido por el tejido linfoide, distribuido en el hombre en los nódulos y ganglios linfáticos, bazo, timo, placas de Peyer, apéndice y amígdalas (formadas por la confluencia de nódulos linfáticos). Su célula básica es el linfocito. Ocupa los intersticios de las mayas reticulares y su función

es esencial en la iniciación y desarrollo de la Inmunidad humoral y celular.

### 3.1.2.- Linfocitos T y B: características generales

En el hombre existen dos categorías de linfocitos : T y B (149).

Los linfocitos T ó linfocitos timo-dependientes se distinguen por la presencia de receptores de superficie para eritrocitos de carnero y la ausencia de inmunoglobulinas de superficie. In vitro, proliferan tras su estimulación por mitógenos no específicos ó antígenos y no sintetizan inmunoglobulinas. Se originan en la médula ósea a partir de células tronco ó madres (stem cell), diferentes de las responsables de los linfocitos B. Maduran en el microambiente del timo. La corteza de este órgano presenta una actividad enzimática que elimina los linfocitos con características B durante las últimas etapas de la diferenciación tímica (32).

Los linfocitos timo-independientes ó linfocitos B no presentan receptores de superficie para eritrocitos de carnero y la mayoría portan inmunoglobulinas de superficie. In vitro sintetizan inmunoglobulinas en respuesta al estímulo no específico del mitógeno Pockweed y a anticuerpos específicos tratados con antígenos, tales como hematies de carnero, toxinas de la difteria, etc. La especificidad de la célula B para cada tipo de antígeno está determinada por la estructura inmune Ia, que como el producto de los genes Ir ó de la respuesta inmune, programa la respuesta de los anticuerpos. Son parte de la progenie de las células troncos de la médula ósea. Conservan su capacidad pluripotencial aún en la vida adulta. Su nombre proviene de su dependencia del microambiente de la Bursa de Fabricio en las aves. En el hombre, los ganglios, los órganos linfoides centrales y la lámina propia del intestino se consideran localizaciones críticas para diferenciación de este tipo celular (32).

La cantidad de linfocitos T y linfocitos B en el organismo es muy difícil de determinar. No sólo influyen las di-



ficultades técnicas, sino que sus valores están afectados por factores fisiológicos: ritmo diario, ciclo menstrual, edad; y otros de tipo ambiental, como alimentación, medio de vida, etc.

### 3.1.3 .- Criterios de diferenciación

Morfológicamente hay poca diferencia entre linfocitos T y B examinados al microscopio óptico y electrónico. Su tamaño oscila entre las 7 y 15  $\mu$ m de diámetro, en dependencia -- del momento funcional en el que se encuentren. Físicamente, los linfocitos T tienen una mayor movilidad electroforética, una menor capacidad de adherencia debido a su superficie lisa y una densidad mayor, que los linfocitos B.

El mejor criterio para la diferenciación entre linfocitos T y linfocitos B son los marcadores de superficie (117). La mayoría se han caracterizado sobre células de ratón. En el -- hombre, sólo se han encontrado algunas estructuras similares, pero es muy posible una mayor analogía a medida que se perfeccionen las técnicas de detección (87, 150).

#### 1) Marcadores propios de linfocitos T:

##### A.- Sistema TL.-

Es un complejo de cuatro antígenos, tres de -- los cuales son propios de timocitos intratímicos del ratón. El -- cuarto es un carácter leucémico que aparece sobre linfocitos maduros.

##### B.- Sistema Ly.-

Es un complejo de cuatro especificidades antigénicas: Ly-1, Ly-2/3, Ly-5, codificado por dos cromosomas distintos. Los genes implicados controlan la especificidad antigénica y están relacionados con la función inmunológica primaria del linfocito. La maduración celular conduce a su expresión génica -- diferencial y en consecuencia a la diferenciación de poblaciones linfocitarias con actividades diferentes. Así, las células Ly--- (1.2.3)<sup>+</sup> son timocitos y precursores intermediarios. Las células Ly-1<sup>+</sup> tienen una actividad ayudadora en la respuesta inmune y -- las Ly-(2.3)<sup>+</sup> desarrollan una actividad citotóxica/supresora. En todos los casos, su aparición es independiente de la exposición

de la célula al antígeno.

C.- Antígeno  $\theta$  ó Thy-1, y Gx.-

Aparecen en las primeras etapas de maduración intratímica y se pierden a medida que avanza el proceso. Su proporción es muy baja una vez alcanzado el máximo grado de madurez. El segundo es uno de los mejores ejemplos de interacción entre el genoma de un virus y el huésped.

D.- Receptores para hematíes de carnero.-

Los linfocitos T poseen un conjunto de estructuras en su superficie de naturaleza desconocida que permite la formación de rosetas espontáneas con hematíes de carnero. La reacción no tiene base inmunológica precisa.

E.- Receptores para anticuerpos monoclonales.-

La puesta a punto de las técnicas de monoclonación de proteínas, mediante la hibridación celular (141, 142) ha permitido la obtención de anticuerpos monoespecíficos, capaces de diferenciar las distintas poblaciones funcionales de linfocitos T hasta el momento conocidas. Gracias al carácter monoclonal del anticuerpo son capaces de reconocer exclusivamente estructuras de su superficie propias de cada una de las subpoblaciones, presentando un alto grado de especificidad (143, 144, 145).

ii) Marcadores de linfocitos B

A.- Aloantígenos Ly 4, 6, 7, 8.-

El más conocido es el producto del loci 4/2. Es un antígeno selectivo que se expresa en la diferenciación del linfocito B y se mantiene sobre células plasmáticas secretoras y totalmente diferenciadas.

B.- Antígenos MLBA y MSPCA.-

Ambos son propios del ratón y del hombre. El primero es el primer marcador diferencial del linfocito B. El segundo aparece a lo largo de la diferenciación paralelamente al Pc-1 y se mantiene sobre células maduras secretoras.

C.- Receptores para componentes del complemento.-

Juegan un importante papel en los mecanismos de control de la respuesta inmune. Se han detectado sobre la superficie de los linfocitos B receptores para el C3b y C4b (87). =

Este último coopera con el primero en la unión de los complejos= antígeno-anticuerpo sobre la superficie celular. Aparecen en un= estado de diferenciación posterior a las inmunoglobulinas y desa= parecen una vez alcanzado el máximo grado de madurez (151).

D.- Formación de rosetas específicas.-

Aproximadamente el 50% de las células B forman rosetas con hematies de carnero recubiertos del componente C3 -- del complemento. La base inmunológica de esta reacción queda ex= plicada en el apartado anterior.

iii) Maracadores comunes a linfocitos T y B (78).

A.- Sistema HLA.-

Esta constituido por una serie de antígenos co= dificados por un grupo de genes localizados en el cromosoma 6 hu= mano. Los productos de los loci A, B, C son glicoproteinas y un= polipéptido asociado a la  $\beta_2$ -microglobulina, sobre la superfi= cie de los linfocitos B. Existe una gran similitud en los aminoá= cidos de estas cadenas y las regiones constantes de las inmu= globulinas. Es posible que estos antígenos fueran estructuras de reconocimiento primitivas sobre la superficie celular, a partir= de las que evolucionaron las inmunoglobulinas por un proceso de= translocación y duplicación génica (78). Determinan el número y especificidad de las células T citotóxicas. Para el desarrollo = de esta actividad se requiere la presencia sobre la célula blanco de al menos uno ó dos alelos A ó B comunes con el huésped.

B.- Antígenos asociados a la región I ó Ia.-

Están codificados por la región D del sistema= génico HLA. Sus productos son dos glicoproteinas, expresadas co= mo una única molécula sobre la superficie de los linfocitos B, = algunos linfocitos T y macrófagos responsables de la presenta= ción del antígeno. Codifican para los componentes C2 y C4 del -- complemento y el factor B de la properdina. Son responsables de= las reacciones en las mezclas de linfocitos, propias de la = reacción del "graft versus host". Influyen en la eficiencia de = las interacciones celulares en los procesos de inmunoregulación= (78).

C.- Antígeno Th-B y Ly-6.-

El primero aparece en timocitos inmaduros, perdiéndose con la diferenciación y el segundo sobre linfocitos T y B. No es conocido su significado biológico, ontogénico y funcional (87).

D.- Receptores para el Fc de las inmunoglobulinas.

Los linfocitos B poseen receptores para el Fc de las inmunoglobulinas propias y ajenas, uniformemente repartidos sobre su superficie. Estas inmunoglobulinas ó porciones de la molécula de caracteres análogos a los antígenos del HLA, son -- las responsables del reconocimiento antigénico. En algunos casos , parte de los linfocitos T se tiñen para inmunoglobulinas de su superficie, debido a la presencia de estos receptores sobre su superficie. En 1976 Moretta y colaboradores asociaron su presencia para un tipo determinado de inmunoglobulina, con un posible papel funcional en la producción de anticuerpos. Demostraron que poblaciones para el Fc de la IgG ejercían una acción supresora sobre la proliferación de células B. Las poblaciones que presentaban receptores para la IgM, cooperaban en la producción de anticuerpos (116, 117, 118, 119).

El descubrimiento de receptores para IgA en poblaciones cuya funcionalidad no estaba clara, la dificultad en la repetición de los experimentos y la evidencia de que el efecto final cooperador ó supresor tenía una dependencia crítica de la proporción de linfocitos T con receptores para IgG e IgM, pusieron en tela de juicio los resultados iniciales (73, 190).

Actualmente se considera que los receptores Fc sobre los linfocitos T son marcadores de diferenciación de la edad adulta y posiblemente de poblaciones con distinta funcionalidad. Su influencia en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas está aún por descubrir (180, 182).

No son exclusivos de linfocitos. Se han descubierto sobre macrófagos, células nulas, células K y en muy baja proporción en líneas inmaduras de células B.

iv) Diferente respuesta frente a los mitógenos

Los mitógenos son sustancias capaces de activar la respuesta de los linfocitos, independientemente de la especificidad de su unión al antígeno.

Los mitógenos más utilizados son los inespecíficos. En su mayor parte se trata de proteínas de origen vegetal que se unen a oligosacáridos de la superficie celular. Existen dos grupos:

A.- Mitógenos T: (PHA) fitohemaglutinina y la Concanavalina A (Con A).-

Activan específicamente linfocitos T, pero influyen sobre ambas poblaciones, debido a la liberación de factores solubles que favorecen la reacción de los linfocitos B.

B.- Mitógenos B: mitógeno Pockeweed (PWM).-

Estimula ambas poblaciones, pero la respuesta de las células T es muy pequeña. A este grupo pertenecen las lipoproteínas y lipopolisacáridos de las paredes bacterianas, que al combinarse con un antígeno adquieren fuerte carácter inmunogénico. Su reactividad es diferente, así como los receptores que los reciben sobre la superficie de los linfocitos B. Estas localizaciones están sujetas a un control de tipo genético. En el transcurso de la diferenciación, su afección por los mitógenos se modifica condicionando su reacción ulterior.

#### 3.1.4.- Funcionalidad de las células linfoides

Los linfocitos humanos se han clasificado dentro de subpoblaciones adicionales en base a sus características funcionales y estructurales. Sus concentraciones varían sensiblemente en función de la técnica utilizada para su determinación (7).

1.- Linfocitos B.- Se han definido tres categorías (73):

a) Células con inmunoglobulinas de superficie.  
b) Células con receptores para el Fc de las inmunoglobulinas.

c) Células con receptores para el C3.

Frecuentemente expresan dos ó tres de estos marcadores. Pueden representar diferentes estados de maduración ó poblaciones discretas aún no bien reconocidas.

2.- Linfocitos T.- En función de su modelo antigénico

co de superficie se han caracterizado tres categorías funcionales distintas (32):

a) Linfocitos T citotóxicos.-

Estan sensibilizados para eliminar células que - portan ciertos determinantes antigénicos. Su respuesta puede ser= inducida por drogas y simples haptenos ligados a la superficie ce- lular. Contribuyen a la defensa del ~~hésped~~ contra una amplia gama - de infecciones víricas, bacterianas y parasitarias (32) y son res- ponsables de las alteraciones inmunopatológicas derivadas.

Las reacciones de citotoxicidad requieren la pre-- sencia de al menos uno ó dos antígenos HLA idénticos sobre la cé- lula T y la célula blanco (36, 141). Existen dos hipótesis de re- conocimiento. En un caso, se supone que el linfocito T citotóxico= presenta dos receptores de superficie, uno reconociendo el antíge- no codificado por el virus y otro es un antígeno del HLA. En el - otro caso, el más aceptado para el hombre, se piensa que el linfo- cito reconoce un antígeno HLA modificado por el virus. Es decir,= de una forma ú otra, estas reacciones van dirigidas parcialmente= contra antígenos propios.

Los estudios realizados hasta el momento sugieren - la maduración tímica como vía de adquisición de la capacidad para el reconocimiento de los antígenos HLA modificados. Las células - de sangre periférica estan perfectamente dotadas para realizar es- ta función.

b) Linfocitos T cooperadores en la respuesta de pro- ducción de anticuerpos (140).-

In vitro, la síntesis de inmunoglobulinas es de- pendiente de la presencia de un número adecuado de linfocitos T - en cultivo. Los mecanismos de colaboración dependen de fenómenos tales como la manera de presentar el antígeno a los linfocitos B= y los requerimientos inmunes para el desarrollo y diferenciación= de la célula en cultivo.

Presentan un marcador de diferenciación en forma de receptor para el Fc de la IgM (117, 118). Como ya hemos indicado= esta característica estructural no es exclusiva de este tipo de=

diferenciación. Se han detectado células con receptores para IgA, con estas características (39). Su carácter cooperador depende de la proporción en la que se encuentren en el cultivo y del tipo de inmunoglobulina, cuya síntesis regulan (227, 229).

c) Linfocitos T supresores (121).-

El sistema inmune funciona a través de un elaborado sistema de interacciones celulares, algunas de las cuales inician y otras limitan las respuestas inmunes específicas. Esta función secundaria es realizada por los linfocitos T supresores.

Su modo de acción aún no se conoce. Parece ser que actúan reconociendo sitios de combinación específica para el antígeno denominados idiotipos, sobre la superficie de otras células inmunológicamente activas. El idiotype estimula la respuesta de un anti-idiotipo que limita la extensión y duración de la respuesta inicial.

Las células supresoras participan en el control de otros modelos de diferenciación celular no relacionados con el sistema inmune: eritropoyesis, granulopoyesis y serie plaquetaria.

Su papel central en la modulación de la respuesta inmune lleva a pensar que una alteración funcional, ya sea primaria o secundaria, contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones crónicas y rechazo de injertos (3).

d) Células Nulas .-

Están constituidas por un grupo celular que ha perdido los marcadores de linfocitos T o B, incluyendo las propias células madres o pluripotenciales.

e) Células K.-

Poseen actividad citotóxica no específica. Tienen receptores para el Fc de las inmunoglobulinas y su puesta en contacto con células recubiertas de anticuerpos determina la lisis celular. Esta forma de citotoxicidad se ha distribuido en una clase especial de células mononucleares, carentes de otros marcadores de diferenciación. Esta implicada en la defensa del huésped contra la infección y en la patogénesis del daño tisular que acompaña muchos desórdenes inmunológicos (160). No son exclusivas de los estados patológicos. Juegan un importante papel en el desarro

llo y generación de células tumorales.

### 3.2.- Factores implicados en la respuesta de IgA

#### 3.2.1.- Rutas de entrada antigénica e inducción de la respuesta de IgA

La inducción de una respuesta de IgA a un antígeno - ingerido requiere su exposición a los linfocitos del tejido linfóide asociado al tracto gastrointestinal. La interacción es crítica para el desarrollo de los centros germinales, capaces de dar una respuesta adecuada.

Las rutas antigénicas de entrada a nivel del sistema gastrointestinal son principalmente dos:

a) A través de los epitelios especializados que recubren el tejido linfóide localizado en esa zona. Las células epiteliales, que carecen de glicocalix, son capaces por pinocitosis de tomar moléculas de la luz intestinal y liberarlas en los espacios extracelulares, donde interaccionan con los linfocitos.

b) O bien, a través de las células del intestino - por exocitosis dentro de la lámina propia. Parte de las moléculas pasan a la circulación portal a través de las venas mesentéricas y de ahí al hígado. Otra parte, las solubles en los lípidos, entran en el torrente linfático y regresan de nuevo a los nódulos mesentéricos.

Los experimentos realizados hasta el momento sugieren el epitelio especializado que recubre las placas de Peyer en la zona del íleon distal, como principal ruta de entrada antigénica para la inducción de la respuesta de IgA. Aún no se ha podido determinar la localización precisa de interacción con el antígeno. Algunos autores sostienen que la presencia de centros germinales en las placas de Peyer, apoya la hipótesis de su papel primario en la respuesta de IgA. De hecho, la falta del nódulo mesentérico no elimina de la lámina intestinal las células que contienen IgA - aparecidas tras la inoculación de un antígeno en la zona epitelial de las placas (79). Ahora bien, es muy posible que estas cé-



lulas IgA<sup>+</sup> sean una respuesta secundaria al estímulo. El antígeno no puede atravesar, y de hecho lo hace, la placa y alcanzar el nódulo mesentérico sin encontrar una célula B virgen capaz de dar una respuesta primaria inicial para la síntesis de IgA.

### 3.2.2.- Lineas celulares B

Las células B que maduran en el hígado fetal y en la médula ósea derivan de una célula pre-B que contiene cadena  $\mu$  intracelular y no expresa IgM sobre su superficie (25). Su división continuada da lugar a una población de pequeñas células -- pre-B, que presentan IgM sobre la superficie (IgM-S<sup>+</sup>) (28).

La aparición de la cadena  $\delta$  es posterior a la de la cadena  $\mu$ . Es timo y antígeno independiente. La mayoría de los linfocitos periféricos portan IgM e IgD y su secuencia de diferenciación parece ser: linfocitos B IgM-S<sup>+</sup> — IgD-IgM-S<sup>+</sup> — IgD-S<sup>+</sup>. Se piensa que la IgD esta involucrada en la protección de los linfocitos B contra los fenómenos de tolerancia (99, 100).

La secuencia de aparición de otros isotipos, como la IgA e IgG no esta clara. Hay evidencias a favor y en contra de una presencia anterior a la de la cadena  $\delta$ , ó bien tras una pérdida de este marcador. En cualquier caso, sólo las células B IgM-S<sup>+</sup> y IgD-IgM-S<sup>+</sup> dan lugar a células plasmáticas productoras de IgA e IgG sin necesidad de atravesar una fase de diferenciación en la que estos isotipos se expresen sobre la superficie (62, 188). Una vez que la célula esta comprometida en la expresión de IgA e IgG, sólo da una respuesta primaria ó secundaria del mismo isotipo. La célula ha alcanzado un paso irreversible en la diferenciación.

Recientemente Honjo y Kataoka han dado una explicación genética a la aparición secuencial de los diferentes tipos de inmunoglobulinas. Parece ser que el orden de los genes que codifican para las cadenas pesadas es  $V_H$ -espaciador- $\mu$ - $Y_3$ - $Y_1$ - $Y_{2A}$ - $\alpha$ . El gen  $\delta$  aún no se ha localizado. Si como las experiencias de hibridación molecular con los mielomas de ratón han mostrado, la traslocación de un gen  $V_H$  a un gen isotipo  $C_H$  va seguido en algunos casos por la delección del próximo, la cadena  $\alpha$  en una célula

la plasmática normal supondría un paso final en la diferenciación de la célula B. La delección puede ocurrir antes y después de que haya comenzado la secreción de inmunoglobulinas (72).

En animales de experimentación se ha detectado una elevada proporción de células linfoides con IgA de superficie en las placas de Peyer y en el conducto torácico. Curiosamente carecían de otros isotipos. En la médula y el bazo su número era menor y expresaban a su vez IgM e IgA en un 20%. En sangre periférica, sólo aparecían acompañados de IgM (1).

Una célula B estimulada antígenicamente es capaz de producir una progenie clonal fabricante de anticuerpos con diferentes cadenas pesadas y el mismo idiotipo (25, 57). Un mismo determinante antigénico sería reconocido por diferentes clones celulares que a su vez, son precursores específicos para otros determinantes antigénicos (29). Esto explica la dificultad que aparece al intentar estudiar la respuesta de IgA. Cuando se observan los clones precursores en los distintos órganos de maduración y más concretamente en las placas de Peyer para antígenos habituales en la naturaleza, como la fosforilcolina y otros presentados con un transportador adecuado, la respuesta es siempre la de células memoria. A pesar de las dificultades, se ha determinado una respuesta primaria que implica a células B ó blastos B procedentes de los nódulos mesentéricos y del mediastino. Localizadas y diferenciadas en células que contienen IgA, no estarían en principio comprometidas para la formación de un isotipo determinado. Su puesta en contacto con el antígeno en los nódulos generaría un clon de linfocitos B plantilla, algunos de los cuales recircularían por las placas de Peyer. Un segundo encuentro con el antígeno en estas localizaciones determinaría una proliferación de centros germinales y la subsiguiente aparición de células plasmáticas en el intestino (106, 137).

La producción de los células plasmáticas de la mucosa no está restringida a este isotipo, aunque es el más común. Las células productoras de IgM son frecuentes en la región yeyunal, donde no hay células que contienen IgD. Por el contrario, en las glándulas paratiroides, nasales y lacrimales, las células --

productoras de IgD son las más habituales. En individuos con deficiencias de IgA, el número de células plasmáticas esta dentro del rango normal en el intestino y las glándulas, pero se elevan los niveles de IgM'e IgD según el caso. En todas las zonas, la mayoría contienen cadena J, lo que sugiere un alto grado de inmadurez (21).

### 3.2.3.- Dependencia tímica de la respuesta de IgA

La biosíntesis de IgA como respuesta a un antígeno no se considera en alto grado dependiente de la función del timo. Su ausencia ó alteración funcional disminuye significativamente - los niveles de IgA sérica y la respuesta de esta inmunoglobulina- a antígenos timo-dependientes (37). En animales timectomizados se han detectado grupos celulares capaces de responder a ciertos antígenos timo-independientes, formando anticuerpos de IgA (37,46,=178). Pero estas observaciones no han sido confirmadas en el hombre hasta el momento.

La cooperación entre las células tímicas y las células capaces de dar una respuesta de IgA en los órganos linfoides- de maduración se ha puesto de manifiesto en multitud de experiencias (25, 95). In vivo, una simple célula T cooperadora es capaz- de ayudar a distintos precursores clonales para varios isotipos.= Por el contrario, in vitro ensayos similares han mostrado un alto grado de exclusividad en el comportamiento de las células T con = respecto a los linfocitos B productores de anticuerpos de diferente espectro electroforético. Trabajos más recientes, sugieren la participación tanto in vivo, como in vitro, de al menos dos clases de células T para el desarrollo de una respuesta óptima de anticuerpos a antígenos timo-dependientes: una célula específica de antígenos y otra reconocedora de alotipo, isotipo ó idiotipo (46) según el caso.

El comportamiento cooperador ó supresor de los linfocitos T en la respuesta de IgA parece estar relacionado con una distribución anatómica de las poblaciones. En las placas de Peyer

aparece un efecto cooperador. En los nódulos periféricos y mesentéricos y bazo tienden a suprimirse en presencia de Con A y mitógenos adecuados. En el hombre, se ha observado en las deficiencias selectivas de IgA un aumento de la actividad y número de supresores específicos para la inmunoglobulina a este nivel.

El reconocimiento de linfocitos B productores de un isotipo particular requiere la existencia de estructuras de reconocimiento específico de isotipo sobre el linfocito T. Aunque se conoce desde hace tiempo la expresión de IgA sobre la superficie de linfocitos B y de receptores específicos sobre linfocitos T en respuesta a un estímulo policlonal, aún no se ha establecido el papel desarrollado por ambos marcadores en la regulación de la respuesta de IgA (162).

#### 3.2.4.- Ciclo celular de la IgA

Como ya hemos comentado, la mayoría de las células progenitoras de los plasmocitos productores de IgA se encuentran en la lámina propia del intestino. Pasan parte de su ciclo vital en las localizaciones linfoides del tracto gastrointestinal y bronquial, donde forman poblaciones enriquecidas capaces de repoblar el intestino (66).

Los experimentos que confirmaron este punto se realizaron sobre animales irradiados. Se comprobó que los precursores de las placas de Peyer se diferenciaban en el bazo e intestino de los receptores, en células productoras de IgA. Los precursores provenientes de los nódulos periféricos proporcionaron células formadoras de otras clases de inmunoglobulinas.

Las placas de Peyer son en sí deficientes en células plasmáticas productoras de IgA. Están pobladas por células precursoras caracterizadas por contener cadena  $\alpha$  y  $\kappa$  (152). Son incapaces de diferenciarse en presencia del antígeno. Los estudios in vitro hacen sospechar la carencia de una población celular necesaria para la respuesta de IgA, bien porque las poblaciones de linfocitos T en la placa hayan sido previamente condicionados=

por otros antígenos orales ó bien porque los macrófagos presentes no sean los adecuados para la presentación del antígeno. Así pues, el condicionamiento para la diferenciación eventual de células plasmáticas en las placas esta asociado con la tendencia a emigrar de los linfoblastos generados en esta zona.

En condiciones fisiológicas, los linfocitos incluso los comprometidos en la síntesis de IgA dejan las placas a través de los conductos linfáticos. Entran en las vías aferentes de los nódulos mesentéricos por el sinusoides subcapsular y sufren un violento proceso de diferenciación y proliferación. Los linfoblastos T y B y los pequeños linfocitos recirculante pasan por la vía eferente del conducto linfático intestinal a la Cisterna de Chily y se incorporan al conjunto de linfocitos circulantes y linfoblastos procedentes de los nódulos periféricos. Desembocan por el conducto torácico en el torrente sanguíneo y se transportan a todo el organismo.

Los blastos B maduros portadores de IgA, provenientes del mesentérico dejan la circulación y se alojan en la lámina intestinal en una pequeña proporción. El resto se dirige de nuevo al nódulo mesentérico y al bazo, donde sufren un nuevo proceso de diferenciación final, que los capacita para su posterior permanencia en el intestino. Por el contrario, los blastos procedentes de nódulos periféricos migran directamente hacia zonas periféricas, donde realizan su función (65).

El proceso de migración condicionada es consecuencia del reconocimiento por parte de las células B y T derivadas del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal, de una señal quimiotáctica procedente del endotelio de los vasos intestinales. Este aspecto supone un compromiso en la diferenciación de los blastos portadores de IgA de las placas de Peyer en blastos portadores de IgA del nódulo mesentérico vinculado a la pérdida de la movilidad celular una vez instaurados en la lámina y de los receptores para el complemento que acompañan la mayoría de las células B de las placas.

El proceso de diferenciación y recirculación por el cual los linfocitos B precursores de IgA llegan a la lámina intestinal

tinal en forma de plasmocitos productores de IgA procedentes de - las placas de Peyer, se denomina "ciclo celular" de la IgA (97).

En el organismo existen otras muchas superficies secretoras selectivamente pobladas de células plasmáticas de IgA. - Su origen parece ser idéntico al de las del intestino. En la glándula mamaria del ratón hay una migración condicionada y retención de linfoblastos B portadores de IgA, derivados del nódulo mesentérico (151). Los linfoblastos de ambas localizaciones son indistinguibles. Carecen de receptores para el complemento. Tienen especificidades para antígenos administrados oralmente (176) y se diferencian en plasmoblastos conteniendo IgA, 24 horas después de su instauración en la zona periglandular (151). La glándula mamaria virgen no tiene esta capacidad de retención. La desarrolla lentamente durante el embarazo ó bien artificialmente mediante un tratamiento hormonal a base de estrógenos y prolactina. La influencia hormonal induce en la glándula mamaria propiedades propias de la lámina intestinal (176). Efectos similares se han obtenido en conejos.

Los blastos del mesenterio también poseen el potencial necesario para migrar hacia los pulmones y tracto genital femenino, donde pueden identificarse 24 horas después de su transferencia (106).

Actualmente se está estudiando la posible localización de estas células en ciertas zonas de la mucosa y la importancia del antígeno local específico sobre la localización celular. Esto explicaría en parte las diferencias existentes en los porcentajes de recuperación de blastos mesentéricos a partir del intestino y la glándula mamaria en individuos activos y no activos. -- Además justificarían el condicionamiento para la migración específica de las células de los nódulos hacia las zonas próximas a su localización.

Resultados similares a los comentados se han encontrado para los linfoblastos T en animales parasitados (152). Esto unido al hecho de que las células T en el calostro y la leche humana muestran modelos de reactividad diferentes a los de sangre -

periférica y análogos a los presentados bajo estimulación antigénica constante en las zonas entéricas ó bronquiales induce a pensar que ciertas poblaciones T también están condicionadas a vivir en el tejido linfoide asociado a la mucosa.

El mecanismo de migración de blastos T y B originados en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal a la mucosa es desconocido. Aparentemente, el desplazamiento es independiente del antígeno (152, 106), pero su presencia incrementa enormemente la cantidad de células productoras de anticuerpos IgA en el intestino. Varias hipótesis se han apuntado con relación a este tema:

La primera considera que las células plasmáticas de IgA intestinales son continuamente reemplazadas por células inmigrantes. Sus niveles se mantienen constantes aún después de nueve días de drenaje continuo del conducto torácico. Esto sugiere que las células presentes (103) deben ser plasmoblastos con capacidad para dividirse in situ, en respuesta a antígenos locales, más que células plasmáticas. Otra posibilidad en este caso, sería suponer una repoblación por células procedentes de otras localizaciones linfoides, como el tejido linfoide asociado a los bronquios. El drenaje del conducto torácico no les afectaría.

El hecho en sí de la migración de los blastos T u B a la mucosa, su no inhibición por IgA dimerica y monomérica ó sueros anti-componente secretorio y la falta de receptores para el componente secretorio sobre los linfocitos, descarta la posibilidad de una migración condicionada por la interacción entre la IgA-S y el componente secretorio producido localmente. Las células inmigrantes no inciden físicamente sobre los epitelios fabricantes de componente secretorio. El componente secretorio no aparece en el suero como si de un factor quimiotáctico se tratara.

La tercera posibilidad supone la intervención de una subpoblación de células T, reconocedora de blastos B portadores de IgA en la lámina intestinal. Las linfoquinas liberadas los atraerían hacia zonas determinadas de la mucosa. A esta hipótesis se opone la observación sobre ratones "nude" de células plasmáticas IgA en el intestino. Sus progenitores alcanzarían ese punto --

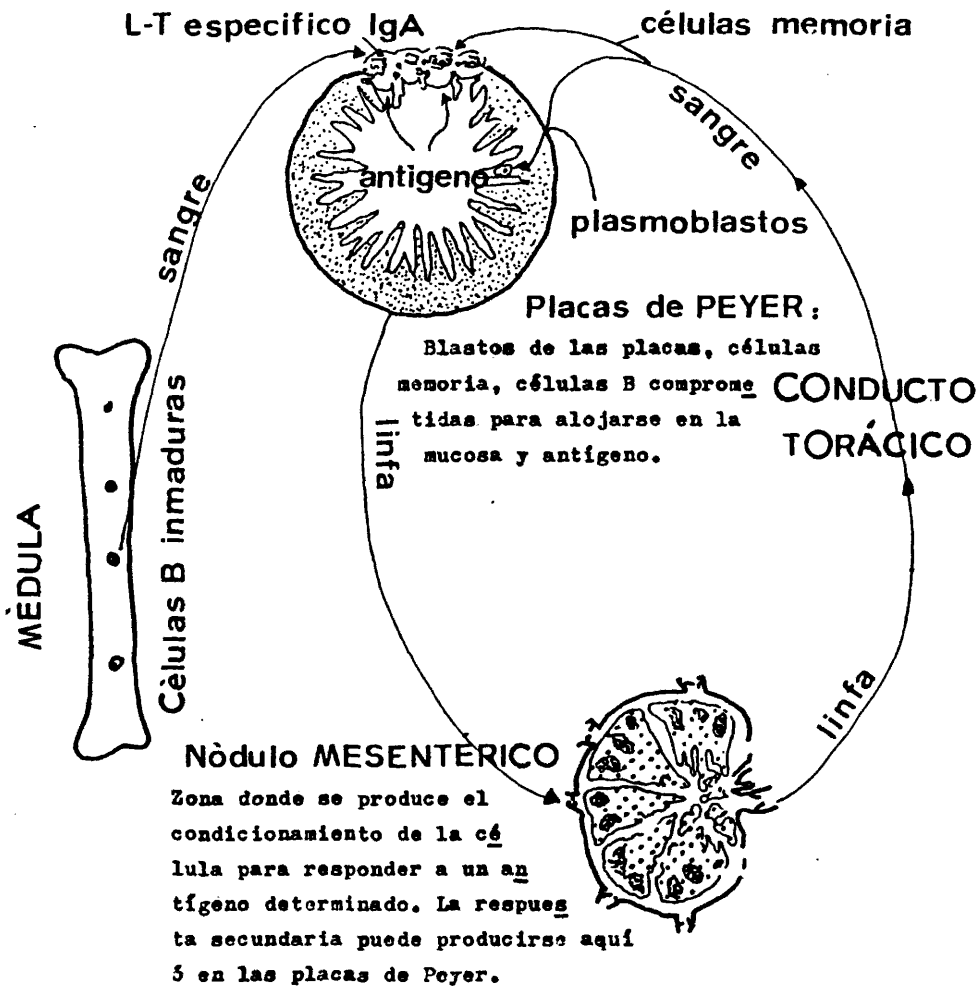


Fig. 8 .- Posible esquema para la población de las zonas de la mucosa con células plasmáticas productoras de IgA y otros isotipos.



sin la intervención de las células T.

La última hipótesis considera las poblaciones T y B predispuestas en estadios iniciales de la diferenciación a revasar el torrente sanguíneo y pasar de la linfa a las localizaciones linfoides de la mucosa. El mecanismo molecular sería idéntico e independientemente controlado de la expresión idiotípica. En la mucosa, los clones B proliferarían selectivamente bajo estimulación intensa de activadores policlonales de origen bacteriano. La diferenciación en células plasmáticas no excluiría la producción de IgG e IgM por algunos clones de la misma subpoblación. Las células T cooperadoras de la síntesis de IgA se generarían en respuesta a una IgA producida localmente y ayudarían a una mayor producción. En individuos deficientes de IgA esta misma población alcanzaría la lámina, pero la falta de diferenciación de las células plasmáticas deja selectivamente poblado al intestino de plasmocitos productores de otros isotipos.

La figura 8 muestra un modelo de sistema inmune asociado a la mucosa. Explica la última hipótesis. Incorpora las evidencias de Geagart y Cebra (1979) sobre la procedencia de los linfocitos B de las placas de Peyer de un "molde" inicial. Recoge las observaciones sobre las células plasmáticas en deficiencias de IgA (21) y el descubrimiento de células T cooperadoras y supresoras específicas de IgA (46).

De acuerdo con este modelo, una subclase de células B inmaduras de la mucosa policlonalmente comprometida se generaría en el hígado fetal ó en la médula y pasaría a la sangre. Alcanzada la mucosa reconocerían una señal quimiotáctica procedente del endotelio, dejarían el torrente sanguíneo. Pasarían a la linfa y de ahí a los nódulos linfáticos asociados a la mucosa. En los nódulos, encontrarían el antígeno procedente del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal ó del tracto bronquial, produciéndose el "condicionamiento". Las células plantilla regresarían a la sangre a través de la linfa eferente, pasando de nuevo por las localizaciones de la mucosa, donde se diferenciarían en plasmocitos no necesariamente isotípicos de IgA. Las células memoria recircularían por el tejido linfoide, volviendo a ponerse en-

contacto con el antígeno en los nódulos linfáticos de la mucosa.= Los centros germinales ya formados, la estimulación intensa y la acción de los linfocitos T cooperadores para la síntesis de IgA - determinarían un fuerte incremento de blastos portadores de IgA - sobre otros isotipos en los mismos nódulos. Los plasmoblastos pasarían de la linfa a la sangre y a la mucosa, donde las células - memoria propagadas recircularían.

### 3.2.5.- Importancia biológica del ciclo celular de la IgA

Las ventajas adicionales del ciclo celular sobre la estimulación antigénica directa de inmunocitos y su diferenciación in situ, ha llevado durante el curso de la evolución del tracto intestinal a desarrollar la compartimentalización y especialización de sus funciones.

La inmunización y protección contra microorganismos entéricos y otros antígenos requiere su entrada limitada. De aquí, que el intestino haya utilizado la mayoría de su longitud en la limitación y absorción simultánea de macromoléculas antigénicas y nutrientes. Un pequeño compartimento ha evolucionado proporcionando un epitelio especializado a la entrada antigénica y la iniciación de una respuesta inmune in situ ó en los nódulos mesentéricos. El mecanismo de difusión paralelamente desarrollado amplifica enormemente la respuesta inmune al permitir la circulación de los linfocitos estimulados por el organismo y su regreso al intestino, completando el ciclo celular.

En general, todas las membranas mucosas y glándulas exocrinas están preparadas para no limitar el destino final de los precursores de IgA a una zona concreta. Esta característica - ha influido de forma decisiva en la evolución y supervivencia de los mamíferos y la especie humana. La IgA materna no absorbida por el intestino infantil le ha conferido durante siglos al recién nacido un mecanismo de protección pasiva a los antígenos bacterianos entéricos a los que la madre era inmune, mientras desarrollaba su propio sistema defensivo. Pero quizás la consecuencia más -

importante del ciclo celular sea la posibilidad de desarrollar nuevas formas de profilaxis inmune mediante la liberación y distribución de células inmunes específicas de antígenos localizados en el tracto intestinal, en zonas anatómicamente distantes y de difícil acceso.

#### 4.- La glomerulonefritis mesangial de IgA: una enfermedad inmune

##### 4.1.- Introducción

La glomerulonefritis mesangial de IgA (GN-IgA) fue descrita por Berger y Hinglais en 1968. Se caracteriza por la predominancia de depósitos de IgA a nivel mesangial y frecuentes lesiones focales y segmentales puestas de manifiesto por microscopía óptica y electrónica. Los depósitos de IgA suelen ir acompañados de C3 y/o IgG e IgM en mucha menor proporción (11).

Esta enfermedad ha recibido diferentes denominaciones a medida que ha ido caracterizándose: enfermedad de Berger, nefropatía de IgA, glomerulonefritis mesangial de IgA. El último término es el más utilizado, tras haberse determinado con mayor precisión la naturaleza de los depósitos de inmunoglobulinas en el mesangio renal. Actualmente se considera una de las nefropatías más frecuentes en nuestro medio.

Una distribución similar de los depósitos de IgA aparece en enfermedades como el Lupus eritematoso sistémico, el Síndrome de Schönleichen Henoch y las hepatopatías alcohólicas. Ahora bien, sus características clínicas y serológicas las excluyen de la nefropatía de IgA, como tal entidad.

##### 4.2.- Características generales

La glomerulonefritis mesangial de IgA aparece en personas jóvenes, manifestándose los primeros síntomas antes de los 35 años en el 85% de los casos. El sexo femenino predomina en la mayoría de las series estudiadas.

La diferente política en cuanto a la práctica de biopsias renales, así como el empleo de antisueros de distintas características de especificidad, llevaron a pensar en una localización de la enfermedad en el área mediterránea. Actualmente, la participación de un factor de tipo étnico ó ambiental se ha descartado totalmente y se considera una de las nefropatías de más amplia difusión por todo el mundo.

A nivel renal, los análisis de microscopía óptica muestran una gran proliferación de células mesangiales e incremento de la matriz. Es muy frecuente la existencia de lesiones focales y segmentales. Las asas capilares periféricas son normales, aunque en algunas ocasiones aparecen lesiones semejantes a las de las glomerulonefritis mesangio-capilares. Es muy posible que en estos pacientes exista una alteración vascular generalizada, debido a la frecuencia de casos con función renal normal y ausencia de hipertensión.

Los estudios estructurales con microscopía electrónica muestran acúmulos de depósitos densos a los electrones repartidos por el mesangio y ocasionalmente en el subendotelio de los capilares periféricos. Menos frecuente, pero característico de la nefropatía, es la aparición de depósitos discretos densos a los electrones epi y/o intramembranosos. La asociación de proteinuria y alteración de la función renal con los depósitos subendoteliales frente a aquellos que sólo presentan depósitos mesangiales (68) - no ha sido confirmada (124).

Clinicamente, la mayoría de los pacientes tienen hematuria macroscópica, frecuentemente asociada a infecciones del tracto respiratorio superior. En un 30-50% de los casos, la hematuria es recurrente. Sólo un 5-15% de los pacientes presentan alguna vez un síndrome nefrótico bioquímico y el 30% nunca tienen hematuria. La nefropatía se descubre generalmente al examinar el estado de salud: proteinuria, hematuria, hipertensión arterial ó fallo renal.

Su pronóstico no es tan favorable como se pensaba - en un principio. El 50% acaba en diálisis ó muere en una ó dos décadas, tras el inicio de la dolencia y el 10% de los fracasos re-

nales que requieren transplante, se deben a esta nefropatía (13,= 41). Es pues, una enfermedad que evoluciona lenta, pero progresivamente hacia la insuficiencia renal.

#### 4.3.- El mesangio renal: modelos inmunopatológicos

El mesangio ocupa una posición intercapilar en el glomerulo. Esta constituido por las células mesangiales y un material fibrilar amorfo ó matriz mesangial. No es una estructura simple de soporte. Participa en el manejo activo y procesamiento de grandes macromoléculas: ferritina, carbón coloidal, agregados de  $\gamma$ -globulinas humanas (112). Las características hemodinámicas y de permeabilidad del glomerulo influyen significativamente en el transporte de estos materiales.

La acumulación y depósito de materiales en el mesangio depende de la cantidad, tamaño y tipo de las macromoléculas -- procesadas. La administración de agregados de IgG ó de albúmina humana a ratas y ratones va seguido de su depósito en la región mesangial, cuatro horas después de la inyección, desapareciendo -- gradualmente entre las 24 y 48 horas siguientes. Los niveles de agregados en sangre son críticos para el depósito (112), no dependiendo de la presencia del complemento (112), para su acumulación en el mesangio. Los agregados de tamaño superior a 7S se localizan sorprendentemente y exclusivamente en la región mesangial, en las zonas de fagocitosis mínima ó no detectable.

La relación entre el sistema fagocítico mononuclear y el mesangio renal es muy estrecha. En los primeros experimentos la captación glomerular de partículas de carbón se observó, sólo -- tras la inyección de dosis que saturaban el sistema reticuloendothelial. La cantidad de proteína agregada o de inmunocomplejos activamente formados y depositados en el glomérulo representaba una pequeña porción de lo captado por el sistema fagocítico. Además, -- la reducción en la captación de macromoléculas por el hígado favorecía la persistencia de niveles relativamente altos en sangre y -- el incremento de los depósitos en la zona mesangial (112).

La mayoría de estos estudios experimentales se han --

realizado con agregados o inmunocomplejos (IC) solubles de IgG e IgM. La utilización de agregados solubles de IgA, como modelo de IC es muy reciente. En estas condiciones se ha detectado una mayor dificultad para su aclaramiento, con un menor catabolismo por parte del hígado, en relación a otras inmunoglobulinas (43). Curiosamente la participación del riñón en el procesamiento es más activa (43). A priori, la manipulación por el sistema fagocítico debía ser análoga a la de agregados de otras inmunoglobulinas. -- Los receptores para IgA, al igual que para IgG, están presentes sobre polimorfos nucleares y monocitos (47). Sin embargo, el catabolismo celular es menor no jugando el complemento ningún papel, = contrariamente a lo observado para la IgG.

La glomerulonefritis por inmunocomplejos se ha dividido en dos grupos (127): aquellos en la que primero aparece afectación mesangial y aquellas en las que primero aparece daño capilar. En ambos, los niveles de acumulación de inmunocomplejos en otras estructuras determinan la gravedad y extensión de la lesión renal. El tamaño parece ser el factor determinante de su localización. Los pequeños inmunocomplejos solubles, capaces de penetrar en las asas capilares producen una glomerulonefritis proliferativa difusa. Los inmunocomplejos menos solubles y de tamaño intermedio ( $1 \times 10^6$  D) tienden a localizarse exclusivamente en el mesangio, provocando una glomerulonefritis mesangial.

El tamaño viene determinado por la razón antígeno/anticuerpo, el nivel de antígeno y su valencia, la clase de anticuerpo y probablemente otros factores como la afinidad y avidez del mismo. Experimentalmente, la inyección intravenosa de inmunocomplejos solubles de alta avidez determina su depósito neto en el mesangio (53). Los formados con anticuerpos de baja afinidad, se localizan preferentemente a nivel subepitelial en las asas capilares. En enfermedades humanas, como la púrpura de Schönleisch Henöch y la misma nefropatía de IgA, no se ha definido su participación, ni la responsabilidad del antígeno/s implicados. En el caso del lupus eritematoso sistémico, donde el antígeno dominante es el DNA nativo, los resultados son muy contradictorios.

El último modelo experimental del daño mesangial inmune fue descrito por Mauer (102). Se basa en la fijación del anticuerpo a un antígeno previamente localizado en el mesangio glomerular. Para ello, se inyectaron conejos con albumina ó IgG humana agregada. Al cabo de 10 horas se transplantó un riñón a un receptor sano, al que se inyectó con anticuerpos anti-albumina ó anti-IgG humana. Días después, los riñones presentaban infiltración glomerular de células polimorfonucleares y depósito de IgG, C3 y fibrinógeno en el mesangio. Más adelante, se produjo proliferación de células mesangiales e incremento de la matriz mesangial. Estos resultados sugieren que una localización persistente de antígenos extraños ó la modificación del mesangio, actuando como un antígeno ajeno, produce un daño mesangial inmune crónico y deterioro -- glomerular progresivo.

Paralelamente a este surgieron otros modelos que -- utilizaban una inmunización crónica con antígenos de alto peso molecular: ferritina a ratones proteinúricos ó tiroglobulina a conejos (58), que conducían al depósito de inmunocomplejos a nivel mesangial. En todos los casos, los depósitos espontáneos ó inducidos no estaban asociados con enfermedad glomerular significativa. Las manifestaciones clínicas aparecían en animales con nefropatía asociada a la membrana basal y en ratas sin otra lesión que un aumento en las resistencias periféricas (139), lo que indujo a pensar en la posible participación de los mecanismos patogénicos responsables de estas lesiones, en el desarrollo del daño mesangial inmune.

#### 4.4.- Modelos experimentales de nefropatía de IgA

El desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia y la obtención de antisueros de mayor calidad pusieron de manifiesto la importancia de la IgA en el desarrollo de las lesiones glomerulares. De aquí, que en los últimos tiempos se hayan desarrollado una serie de modelos experimentales tomando como base esta inmunoglobulina. Los más destacados son :

1.- Rifai (148) demostró que los inmunocomplejos de IgA (IC-IgA) formados "in vitro" ó "in vivo" producían cambios -- histológicos e inmunopatológicos relacionados con la nefropatía de IgA. Para ello, utilizó las fracciones poliméricas y monoméricas de una IgA de mieloma de ratón con especificidad anti-DNP. La cantidad de antígeno y anticuerpo en circulación fue crítica para el desarrollo de la nefropatía, que se producía tanto en exceso -- de uno, como de otro. Los inmunocomplejos de IgA monomérica no -- producían depósitos glomerulares. Por el contrario, los de IgA polimérica aparecieron en el mesangio junto con el antígeno específico y fueron decisivos para la inducción de cambios histológicos nefróticos. Estos resultados están de acuerdo con los descubrimientos posteriores de elevados niveles de IgA polimérica en el -- suero y riñones de pacientes con nefropatía de IgA (38).

2.- Issacs (82) desarrolló un modelo activo de nefropatía de IgA en ratones, utilizando antígenos derivados del -- dextrano. A pesar de ser un trabajo meramente descriptivo del papel de los hidratos de carbono en las enfermedades renales por inmunocomplejos, muestra la amplia respuesta de IgA a estos compuestos. El modelo es uniformemente reproducible y las lesiones histológicas inducidas le hacen particularmente adecuado para el estudio de algunos aspectos inmunopatológicos de la nefropatía de IgA

3.- Por último, Gorley (60) en un modelo de cirrosis inducida por  $CCl_4$  en ratas demostró la presencia de depósitos de IgA a nivel renal, inmunocomplejos de IgA circulantes y elevadas tasas de IgA sérica. Estos resultados confirman el papel del hígado en el aclaramiento de la IgA polimérica y los inmunocomplejos de IgA (135) y afirman las observaciones de suero y riñones de pacientes con nefropatía de IgA en hepatopatías alcohólicas (156).

#### 4.5.- Aspectos inmunológicos de la nefropatía de IgA

##### 4.5.1.- Inmunoglobulinas séricas y complemento

El 50-70% de las nefropatías de IgA presentan elevados niveles de IgA sérica, no correlacionados con los hechos=



clínicos y anatomopatológicos propios de la enfermedad.

Por razones pocas claras, la IgA sérica tiende a -- ser menor en pacientes con fallo renal y se ha encontrado una --- cierta correlación entre los elevados niveles de IgA y un curso - favorable de la enfermedad. En ningún caso, hay asociación entre= los niveles de IgA y los antígenos del HLA específicos.

A pesar de haberse sugerido por Lagrue y Berger -- (93) la posibilidad de que la IgA en esta nefropatía fuera anómala en sus características bioquímicas, hasta 1979 no se admitió como una realidad (101, 102). El 74% de los pacientes presentan un aumento en la proporción de IgA sérica en la fracción (9-21) S, - obtenida por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Esta diferencia se reduce parcialmente en la zona (13-21) S, tras el - tratamiento ácido del suero. La reducción con ditiotreitol, la afinidad por el componente secretorio y la detección de la cadena= J en esta zona del gradiente, son compatibles con la existencia - de formas poliméricas parcialmente en forma de inmunocomplejos en el suero.

La elevación de la IgA sérica tiene un cierto valor diagnóstico, ya que no se ha encontrado en otras nefropatías primitivas. Pero no es específica de la nefropatía de IgA. Niveles - moderadamente altos ó medios aparecen en nefropatías asociadas al síndrome de Schönleisch Henösch, Lupus eritematoso sistémico, y hepatopatías alcohólicas y algunas sin depósitos de IgA como la glomerulonefritis focal ó mesangio capilar y la glomerulonefritis estreptocócica.

Los niveles de complemento sérico parecen ser normales. La falta de actividad hemolítica del suero humano fresco - (CH-50) in vitro, frente a agregados de IgA ( $1-2 \times 10^6$  D), no descarta la posibilidad de una cierta activación in vivo. De hecho, se ha encontrado un aumento en los niveles de C3 (93) y se han detectado inmunocomplejos basados en la fijación del C3 por ensayo de células Raji (88) y unión a la coaglutinina (45) en la nefropatía de IgA y en la nefritis asociada al síndrome de Schönleisch Henösch

#### 4.5.2.- IgA glomerular

La naturaleza y origen de la IgA depositada en el mesangio aún no ha sido aclarada.

En un principio, se consideraron las secrecciones - externas como fuente principal de IgA, dado que las manifestaciones clínicas de la nefropatía aparecían frecuentemente asociadas a infecciones de las vías respiratorias superiores. Salvo en muy contadas ocasiones, hasta el momento no ha aparecido IgA secretoria como tal, en el glomerulo. Algunos autores han tratado de aclarar este punto, determinando la subclase de inmunoglobulina depositada. Pero los resultados hasta el momento son muy conflictivos. Para André (4), los depósitos glomerulares son predominantemente IgA<sub>2</sub> y según Conley (26), son de IgA<sub>1</sub>.

Recientemente utilizando la fijación específica del componente secretorio a la cadena J de las inmunoglobulinas poliméricas (IgA e IgM) se ha demostrado que la mayor parte de la IgA depositada en el mesangio renal de individuos con enfermedad de Berger, síndrome de Schönleichen Henoch y hepatopatías alcohólicas es polimérica (19, 20, 30). Estos resultados están de acuerdo con la mayor patogenicidad de los inmunocomplejos de IgA polimérica - observada en los modelos experimentales (9, 156).

La participación de la IgA en el desarrollo de esta nefropatía es evidente, pero su papel inmunopatogénico es desconocido. El aspecto granular de los depósitos sugiere una enfermedad mediada por inmunocomplejos donde la IgA participaría como antígeno y/o anticuerpo. En este sentido no se ha encontrado actividad de anticuerpo contra diversas estructuras mesangiales, ni de antígeno frente a autoanticuerpos de la clase IgG e IgM, ni aún después de una nefrectomización. De hecho, la IgA aparece como inmunoglobulina única en el mesangio y no se ha descrito enfermedad renal en pacientes con deficiencias selectivas de IgA donde son frecuentes los anticuerpos anti-IgA. La reciente observación de una reacción cruzada entre la sección de un riñón humano normal y el eluido de una nefrectomía con enfermedad de Berger, ha sugerido la po

sibilidad de que la IgA reaccione con el mesangio, ó con un antígeno secuestrado por él (45), de forma análoga a como sucede en los modelos experimentales de esta enfermedad.

El depósito de C3 y properdina en ausencia de componentes tempranos del complemento ( Clq y C4) (167), acompañando a los depósitos glomerulares de IgA, sugiere una activación de este sistema por la vía alterna. Esta activación podría ocurrir paralelamente a la fijación de la IgA en el riñón (165) . La disminución del número de receptores glomerulares para el C3b en riñones con esta nefropatía sugiere además su ocupación por parte de los inmunocomplejos que contienen este componente (161).

#### 4.5.3.- Inmunocomplejos circulantes

Los inmunocomplejos con un importante factor en el desarrollo de las glomerulonefritis ya sean humanas, experimentales ó asociadas a otras enfermedades. No se ha seguido una uniformidad de criterio en cuanto a la frecuencia de su aparición debido a la gran diversidad de métodos utilizados para su detección.

Los primeros ensayos para determinar inmunocomplejos en la nefropatía de IgA basados en la fijación del complemento fueron negativos (159). Un mejor conocimiento de las propiedades biológicas de la IgA permitió determinar inmunocomplejos de IgA en un 30-80% de pacientes con esta enfermedad, según el método utilizado (184, 89), llegando a establecerse una cierta asociación entre la presencia de IC-IgA y la actividad clínica de la enfermedad (89).

De forma indirecta, el hecho de que la mayor parte de la IgA sérica tuviera un coeficiente de sedimentación entre -- (9.21) S y disminuyera selectivamente de un 4-10%, tras el tratamiento ácido del suero en la zona (13-21) S, sugería claramente la existencia de verdaderos inmunocomplejos de IgA. La incapacidad para demostrarlos en muchos casos refleja más la inoportunidad de la determinación, que el bajo límite de sensibilidad de las técnicas usadas. Es muy posible que la dificultad por parte -

del hígado en el aclaramiento de inmunocomplejos ó agragados en — hepatopatías alcohólicas (150) juegue un papel decisivo en el desarrollo de la enfermedad. Además es curioso observar la falta de correlación entre la actividad clínica y el fallo renal y su presencia en el suero.

Sobre el tamaño de los inmunocomplejos de IgA a penas se conoce nada. Se han detectado inmunocomplejos de tamaño intermedio en el síndrome de Schönleichen Henoch. Kaufman (88) afirma que cuando va acompañado de nefropatía de IgA, su tamaño es de 19S. Estudios de ultracentrifugación en gradiente de densidad del suero de estos pacientes en distintas etapas de la enfermedad hacen sospechar una variación del tamaño de los inmunocomplejos en función del momento de la determinación (44).

La mayor patogenicidad de las grandes macromoléculas se sospecha de forma teórica. Experimentalmente se produce una mayor localización mesangial, cuando se forman en exceso de anticuerpo (148). Sus características bioquímicas son importantes. La IgA polimérica resulta crítica para el depósito e inducción de cambios nefróticos. Los inmunocomplejos de IgA monomérica formados in vivo ó in vitro, no producen glomerulonefritis en ningún caso (148). Recientemente se ha confirmado la presencia de IgA polimérica en el mesangio y la alta frecuencia de inmunocomplejos de IgA polimérica en la nefropatía primitiva y hepatopatía alcohólica.

La confirmación final de su participación en el desarrollo de estas enfermedades requiere la detección del antígeno. Elevados títulos de anticuerpos específicos contra agentes del tracto respiratorio superior: micoplasma pneumoniae, virus influenza, antígenos de la flora intestinal y antígenos dietéticos, en relación con exacerbaciones agudas asociadas a hematuria macroscópica, hacen pensar en su posible implicación patogénica. Junto a estos deben considerarse aquellos que afectan de forma primaria a la mucosa, donde la IgA juega un papel preponderante.

#### 4.6.- Aspectos inmunogenéticos de la nefropatía de IgA

La frecuencia de lesiones renales y anormalidades inmunológicas en familiares próximos a los pacientes con nefropatía de IgA hablan en favor de la participación de algunos aspectos genéticos en el desarrollo de esta entidad.

Las diferencias étnicas y geográficas de las series estudiadas no han permitido establecer un resultado unánime sobre su asociación con el sistema HLA. En Francia, donde su incidencia es muy elevada, el riesgo es más alto en poblaciones BW35 (15) y se asocia con la prevalencia de inmunocomplejos de IgG (107). En otras áreas geográficas y en España, no se ha detectado esta predominancia, ni una asociación directa con los antígenos A, B, C y DR (41, 44), ni relación entre ellos y la función renal. Los niveles de IgA sérica y la presencia de inmunocomplejos de IgA. Sólo en algunas ocasiones, se ha observado un incremento en las frecuencias del HLA-B12, CW1 (45, 19) y algunos antígenos del DR (45). - Japón es el único caso, donde la asociación es amplia y significativa con el antígeno DEm, fuertemente ligado al DRvG (91).

En otras enfermedades como la dermatitis herpetiforme que presenta depósitos continuos de IgA sobre la piel, hay una predominancia de antígenos del HLA B8 y DW3/DRW3. Estos antígenos están asociados con un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes y un defecto en la función Fc receptora del sistema reticuloendotelial, en pacientes e individuos sanos (119).

La observación de anormalidades en la función inmune reguladora en familiares próximos a los pacientes con lupus eritematoso sistémico llevó a pensar en una posible participación genética tanto en el desarrollo de esta enfermedad, como de la nefropatía de IgA. En un principio, la teoría propuesta sólo permitía especular sobre el desarrollo de la nefropatía. Se suponía la existencia de dos clases de genes ligados en un sentido no Mendeliano. Uno controlaría la expresión de funciones inmunes de reconocimiento y regulación (genes HLA) y el otro controlaría las entradas y salidas del sistema: producción de inmunoglobulinas, formación de inmunocomplejos y respuesta inflamatoria. El descubrimiento reciente de ciertos antígenos muy intimamente ligados al HLA-D=

sobre linfocitos B (53) y cuya presencia incrementa en un 4-5% el riesgo de la nefropatía, ha dado cierto cuerpo a esta teoría habriendo un importante campo de experimentación para el esclarecimiento de los aspectos inmunogenéticos que concurren en el desarrollo de esta nefropatía.

4.7.- Glomerulonefritis mesangial de IgA asociada al síndrome de Schönleichen Henoch y a las hepatopatías alcohólicas

Estas enfermedades tienen como característica común la presencia de elevados niveles de IgA sérica en gran cantidad de casos y su depósito constante en el mesangio y la piel. Histologicamente son indistinguibles y sólo por manifestaciones clínicas extrarenales pueden diferenciarse.

Hay algunas evidencias a cerca de un posible mecanismo patogénico común para la nefropatía de IgA y la nefritis del Schönleichen Henoch (38). Se han detectado altos niveles de IgA polimérica sérica, parcialmente en forma de inmunocomplejos y depósitos de la misma a nivel mesangial en ambas entidades (27, 43, 88). Esto sugiere que el defecto básico podría residir en una anormal tendencia a elevar el grado de polimerización de la IgA en ambas entidades.

En enfermedades hepáticas hay un incremento en los niveles séricos de IgA monomérica y polimérica, parcialmente en forma de inmunocomplejos e IgG (150), probablemente debido a la necesidad de neutralizar antígenos absorbidos por el intestino. Los niveles de IgA se correlacionan con la severidad del daño hepático (45) y su presencia a nivel glomerular es muy elevada en pacientes con cirrosis alcohólica. Su origen es desconocido. Pero dada la importancia del hígado en el aclaramiento de la IgA polimérica, es muy posible que al igual que en los modelos experimentales, un fallo hepático determine una elevación en el tiempo de persistencia de los inmunocomplejos de IgA, favoreciendo el depósito en el riñón y el desarrollo de la nefropatía (39).



192

# OBJETIVOS



## 2.- OBJETIVOS

A pesar de la gran cantidad de trabajos dedicados al estudio de la patogenia de la nefropatía de IgA, hasta el año 1979 no empezaron a considerarse las alteraciones en las células participantes en la respuesta inmune, un factor importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Dada la poca cantidad de datos existentes en la literatura, el objetivo principal de este trabajo fue el estudio de las alteraciones celulares que pudieran explicar los elevados niveles de IgA polimérica, parcialmente en forma de inmunocomplejos, encontrados en el suero y riñones de estos pacientes (39, 101).

La presencia de hematuria macroscópica tras infecciones del tracto respiratorio superior nos llevó a suponer que los linfocitos circulantes de los pacientes con nefropatía de IgA, -- provenientes de las secreciones externas, producirían altas cantidades de IgA polimérica después de la estimulación viral. Para aclarar este punto, se estudiaron las características bioquímicas de la IgA producida por las células mononucleares obtenidas de sangre periférica en respuesta a la estimulación policlonal del mitógeno Pockeweed (PWM). Se analizaron la cantidad y calidad de las células implicadas en la biosíntesis de IgA, su grado de diferenciación y su capacidad de respuesta en presencia de sueros específicos anticadena J humana.

Como la respuesta formadora de un isotipo determinado es consecuencia de un elaborado sistema de interacciones celulares, cualquier fallo en la cadena reguladora nos conduciría a la expresión anómala de sus funciones específicas y a una alteración en el fino mecanismo de control. Esto nos indujo a estudiar los factores celulares implicados en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas. Se cuantificaron las poblaciones de linfocitos T reguladores y su actividad cooperadora ó supresora sobre la síntesis de inmunoglobulinas en respuesta a la estimulación poli-

clonal del PWM y la Con A.

La detección reciente de inmunocomplejos de IgA e -- IgG en el suero de estos pacientes durante los episodios de hematuria macroscópica (45) y de forma permanente los de IgA, así como las evidencias sobre el efecto modulador de estos inmunocomplejos sobre la síntesis de inmunoglobulinas, ya sea por su interacción con los linfocitos T ó B (45), nos llevaron a estudiar el --- efecto del suero de estos pacientes y los agregados de IgA monomérica, IgA polimérica e IgG, sobre:

- la síntesis de inmunoglobulinas en respuesta al PWM.

- la actividad supresora de células T inducidas por la Con A.

- la generación de células reguladoras en respuesta a la estimulación policlonal del PWM y la Con A.

Por último para conocer si algún trastorno de la inmunoregulación podría transmitirse genéticamente, se estudio en los familiares próximos a los pacientes con nefropatía de IgA, la modificación de los parámetros inmunológicos descritos en los apartados anteriores.



SI<sup>2</sup>

# MATERIAL Y MÉTODO

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- Materiales

##### 3.1.1.- Pacientes

Se han estudiado 35 pacientes con nefropatía IgA establecida por biopsia renal. El criterio diagnóstico se basó en la presencia de IgA en el mesangio glomerular asociada ó no a otras inmunoglobulinas y complemento. Se excluyeron aquellos pacientes que tuvieron evidencias clínicas ó bioquímicas de enfermedad hepática, síndrome de Schönleichen Henöch, lupus eritematoso sistémico u otras enfermedades sistémicas. Los controles fueron voluntarios pertenecientes a los miembros de plantilla, estudiantes de medicina y personal de laboratorio, con edades y sexos comparables a los pacientes estudiados.

##### 3.1.2.- Reactivos y componentes especiales

Para la realización del cultivo y posterior cuantificación de inmunoglobulinas y análisis de receptores se han utilizado los siguientes reactivos:

- Lymphoprep (Hüco Erlöss)
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Flow Laboratories)
- Suero de ternera fetal descomplementado (")
- Glutamina (")
- Penicilina/Estreptomycin (")
- Pockweed Mitogen (Gibco)
- Concanavalina A (Sigma)
- Neuraminidasa (Behring Diagnostic)
- Sueros comerciales específicos anti-cadenas pesadas  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\mu$  humanas, obtenidas en conejo y antisuero humano total (Operón).
- Sueros comerciales específicos conteniendo los fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpos anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM - marcados con fluoresceína, obtenidos en cabra (Cappel Laboratories)

- Suero comercial específico marcado con Rodamina= anti-componente secretorio humano (Atlantic Antibodies). Suero co= mercial específico anti-componente secretorio obtenido en conejo= (Dakopatts y Behring Diagnostic).

- Suero comercial anti-lactoferrina humana (Behring Diagnostic)

- Suero comercial específico anti-cadena J humana - obtenido en cabra (Bering Diagnostic)

- Suero comercial específico anti-IgG de cabra obte= nido en conejo, marcado con Rodamina (Cappel Laboratories)

- Suero comercial específico anti-IgG de ratón obte= nido en cabra, marcado con fluoresceina (Cappel Laboratories)

- Anticuerpos monoclonales comerciales específicos= anti-receptores de células T supresoras/citotóxicas (OKT8), anti-receptores de células T cooperadoras (OKT4) y anti-receptores es= pecíficos de células T totales (OKT3) obtenidos en ratón.

-  $^{125}\text{I}$  para el marcaje de proteínas (Amershan)

- Albumina sérica bobina (Sigma)

- Shepharosa activada con CNBr (Pharmacia Fine)

- DEAE-Celulosa (Watman)

- Shephadex G-50 y G-200 (Pharmacia Fine)

- Ultrogel ACA-22 y ACA-34 (LKB)

- Ditiotreitól (Sigma)

- Iodoacetamida (BDH)

- Agar Noble

- Azul Trypan (Merck)

- Placas para cuantificar inmunoglobulinas (Kalles--  
tad)

- Placas de acetato de celulosa para inmunoelectro-  
foresis (Kallestad).

### 3.1.3.- Aparatos

- Microscopio óptico Nikon 112925

- Centrifuga termoregurable PR-6000

- Microscópio de fluorescencia Nikon
- Espectrofotómetro de ultravioleta modelo SP1800 =
- Contador de radiaciones modelo 500C-800C (Packard)
- Colector de fracciones LKB
- Calculadora programable modelo Olivetti 3000
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de cultivos estériles
- Cámara de conteo Neubauer.

#### 3.1.4.- Soluciones más utilizadas

##### Solución de Hank

###### - Solución A:

- a)  $\text{ClNa}$ ..... 80 g=
- $\text{ClK}$ ..... 4 g=
- $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 1 g=
- $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ..... 1 g=
- Agua destilada ..... 400 ml=
- b)  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  ..... 1,4 g=
- Agua destilada..... 50 ml=
- Mezclar a y b y completar hasta 500 ml -

con agua destilada.

###### - Solución B:

- $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ..... 1,52 g
- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  ..... 0,6 g
- Glucosa ..... 10 g
- Agua destilada..... 500 ml

###### - Solución C:

- $\text{CO}_3\text{HNa}$  ..... 1,4 g
- Agua destilada..... 100 ml

Para su utilización: mezclar un volumen de solución A con un volumen de solución B y 18 volúmenes de agua destilada. Añadir un ml de solución C por cada 40 ml de la mezcla anterior.

Solución de lisis de hematies:

ClNH<sub>4</sub> ..... 8,29 g  
CO<sub>3</sub>HK ..... 1,0 g  
EDTA ácido ..... 0,02 g  
Agua destilada.....100 ml  
Ajustar el pH a 7,4 y diluir al 1/10 para su u

tilización.

Medio de cultivo enriquecido

RPMI 1640 al que se añade:  
L-Glutamina 2 mM  
Penicilina 100 ui/ml  
Estreptomycin/Penicilina 50 ug/ml

Solución de Azul Tripán

Azul Tripán al 2 % en agua destilada  
ClNa ..... 4,5%  
SE mezclan cuatro partes de azul tripan con una

de ClNa.

3.2.- Métodos

3.2.A.- Técnicas Inmunoquímicas

3.2.A.1.- Aislamiento de IgG

El aislamiento de IgG se realizó mediante cromatografía de afinidad en DEAE-Celulosa (135).

La IgG se obtuvo a partir de sueros de sujetos normales y pacientes con mieloma de IgG.

La sangre extraída por punción venosa se dejó coagular. Una vez retraído el coágulo, se centrifugó de nuevo durante 30 minutos a 6000 xg para eliminar el posible sedimento. La capa sobrenadante se dializó frente a solución tampón fosfato 0.01 M - pH 8, durante 6 ó 8 horas a 4°C y con agitación continua. Finalizado el proceso, se centrifugó de nuevo y se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa 52 equilibrada en el mismo tampón. En estas condiciones de fuerza iónica y pH, la IgG sérica se eluyó a través de la columna. El resto de las proteínas quedaron unidas a los grupos



activos de la resina cambiadora de aniones.

Se recogieron fracciones de unos 8 ml de volumen, = en las que la presencia de proteína se determinó por precipitación con una gota de ácido sulfosalicílico al 20%. Las fracciones proteicas se mezclaron y concentraron frente al vacío ó por precipitación con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  2M. El grado de pureza y agregación se determinó por inmunolectroforesis, inmunodifusión doble bidimensional y filtración en columna de Shephadex G-200, respectivamente. La concentración de proteína se determinó por inmunodifusión radial y espectroscopía de absorción ultravioleta.

#### 3.2.A.2.- Aislamiento de IgM

La IgM se obtuvo a partir de sueros de pacientes con macroglobulinemia de Waldenström.

La fracción de  $\gamma$ -globulinas séricas se precipitó -- con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  al 45% a pH 7. El precipitado se lavó dos veces con este medio y se centrifugó a 1.500 xg durante 15 minutos. Se redisolvió en tampón fosfato salino 0.15 M pH 7,3 y se dializó toda la noche frente a este medio, para eliminar los restos de sulfato.

El dializado se aplicó a una columna de Ultrogel ACA-34 y se eluyó en el mismo tampón. La localización de las fracciones que contenían IgM se realizó por inmunodifusión doble y su grado de pureza se ensayó por inmunolectroforesis frente a sueros anti-IgM y antisuero humano total. Se mezclaron y concentraron, cuantificándose por inmunodifusión radial en placas comerciales de Kallestad. La IgM se llevó a una concentración final de 10 mg/ml para su posterior utilización.

#### 3.2.A.3.- Aislamiento de IgA

Se aisló por cromatografía de afinidad de DEAE Celulosa (135) a partir de sueros de pacientes con mielomas de -- IgA.

La IgA se precipitaba del suero con una solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  2M a Ph 7 y en frío. El precipitado se dializaba fren-

te tampón fosfatos 0,01 M pH 8.

El dializado conteniendo una cantidad de 2 g de proteína se cromatografiaba en una columna de DEAE-Celulosa 55, equilibrada en el mismo tampón.

En estas condiciones, la IgG se eluye a través de la columna, quedando retenidas la IgA y otras proteínas séricas en los grupos activos de la resina. Cuando la densidad óptica de las fracciones IgG eluidas fue menor de 0,02, se modificó la fuerza iónica del medio, mediante un tampón fosfatos 0.05 M pH 8. La IgA comenzó a eluirse. Su presencia se determinó por inmunodifusión doble frente a distintos sueros monoespecíficos anti-IgA, anti- $\beta_2$  macroglobulina, antisuero humano total y anti-albúmina, principales contaminantes en este proceso técnico. Las fracciones se mezclaron y concentraron, analizando su grado de agregación por filtración en Shephadex G-200. La IgA se cuantificó por inmunodifusión doble y se llevó a una concentración final de 10 mg/ml

Cuando quería separarse la fracción monomérica de la fracción polimérica de esta inmunoglobulina, la solución conteniendo los 2 g de proteína se cromatografió en DEAE-Celulosa 50 y se eluyó con un gradiente lineal de concentración a pH 8 que se inició con una solución fosfatos 0.05 M pH 8 y terminó en una solución fosfatos 0.05M ClNa 0.2M. En estas condiciones, se eluyeron dos picos. El primero contenía IgA monomérica 7 S con una pureza del 98% y trazas de IgG, puesta de manifiesto por inmunoelectroforesis frente a sueros monoespecíficos. El segundo pico era más rico en IgA y contenía algo de  $\beta_2$ -macroglobulina y albúmina. Por filtración en Shephadex G-200 se separó en dos picos de los cuales, el primero estaba constituido por IgA polimérica y  $\beta_2$ -macroglobulina y el segundo por IgA monomérica 7S, analizados por inmunoelectroforesis frente a sueros monoespecíficos y ultracentrifugación en gradiente de densidad. Este último pico se unió al obtenido en primer lugar y se concentró. Lo mismo se hizo con el pico polimérico, cuantificándose ambos por inmunodifusión radial.

#### 3.2.A.4.- Inmunodifusión doble bidimensional

Se utilizó el método de Ouchterlony (132). Para ello, se preparó una solución de Agar noble al 1,5% en tampón fosfato 0,15M pH 7,3. El agar fundido al baño maría se distribuyó en alícuotas de 10 ml, guardándose a 4°C.

Para la preparación de las placas se refundió el agar por calentamiento al baño maría. La solución se agitó repetidamente con una varilla de vidrio para eliminar las burbujas de aire del medio. Con una pipeta se depositó en placas de plástico-Petri colocadas sobre una superficie horizontal. Una vez frías, se guardaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las placas se utilizaron en un plazo no mayor de dos días, después de su preparación.

### 3.2.A.5.- Inmunoelectroforesis

Se realizó en placas de acetato de celulosa, equilibradas en tampón veronal/ veronal sódico 0.03 M pH 8,6. Estas placas poseen una distribución alterna de pocillos de 1 mm de diámetro y trincheras de 2 mm de ancho.

Las muestras teñidas con una gota de azul de bromofenol utilizado como marcador de desarrollo al unirse específicamente a la albúmina sérica, se aplicaron cuidadosamente en los pocillos con una pipeta calibrada. Las placas se llevaron a una cubeta de electroforesis que contenía tampón veronal/ veronal sódico 0.03 M pH 8,6 y se les aplicó una caída de tensión de 100 voltios durante 90 minutos (30 vol/cm).

Finalizada la electroforesis, se rellenaron las trincheras con los antisueños correspondientes y se guardaron en cámara húmeda. Al cabo de 24 ó 48 horas se leyó el desarrollo de bandas.

Las bandas de proteína se tiñeron y fijaron por inmersión en una solución de metanol/acético (8/1) en agua, a la que se añadió 0,5 mg/ml de azul de comassie. A las 18 horas se lavó el gel con la misma solución, pero sin colorante hasta que las bandas aparecieron con toda nitidez.

### 3.2.A.6.- Aislamiento de IgG de conejo

Se realizó según una modificación del método de Peiperton (135).

Se tomaron 25 ó 30 ml de suero de conejo dializado frente a tampón fosfatos 0.01M pH 8. El dializado se centrifugó a 1.400 xg, durante 15 minutos para eliminar sustancias precipitables en ese medio y se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa 55, equilibrada en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5 ó 9 ml y aquellas cuyas densidades ópticas fueron menor de 0.02, se concentraron y se ensayó su pureza por inmunodifusión doble e inmunolectroforesis, frente a un antisuero anti-IgG de conejo y antisuero de conejo total.

La concentración de IgG se determinó por espectroscopía de absorción molecular y se llevó a una concentración final de 10 mg/ml para su ulterior utilización.

### 3.2.A.7.- Obtención del suero de carnero anti-IgG de conejo

7.5 mg de IgG de conejo aislada según el procedimiento anterior, se llevaron a un volumen de 0.5ml de solución salina fisiológica 0.15 M pH 7,3 y se agregaron por calentamiento a 65°C, durante una hora.

Tras comprobar el grado de agregación por filtración en Shephadex G-200. la proteína se llevó a un volumen de 4 ml en solución salina y se diluyó al 1:3 en adyuvante completo de Freund

3 ml de la preparación se inyectaron intramuscularmente en cada una de las patas de un carnero. Al cabo de un mes, se inyectó de nuevo repitiendo la operación 20 días después. Transcurridos dos meses desde el inicio de las series de inyecciones, se extrajo sangre y se comprobó su titulación frente a IgG de conejo. Siendo bastante buena, se sangró definitivamente al carnero y el suero se guardó a -20°C para su posterior utilización.

### 3.2.A.8.- Marcaje de proteínas

Se utilizó el método de Hunter y Greenwood (1962), empleando la Cloramina T como oxidante débil (79).

A 50  $\mu$ l (20-50  $\mu$ g) de la proteína a marcar, aislada y purificada por métodos habituales, se le añadió 1 mCi de  $^{125}\text{IK}$  diluido al 1/2 en tampón fosfatos 0.5 M pH 7,5 y 50  $\mu$ l de Cloramina T (2 mg/ml). La proteína se dializó previamente frente a tampón fosfatos 0.1M pH 7,4.

La mezcla se agitó durante 1 minuto. A continuación se añadieron 50  $\mu$ l del agente reductor ó metabisulfito sódico (2 mg/ml) y se agitó suavemente durante 3 minutos. La reacción se finalizó por adicción de 200  $\mu$ l de IK 1M en tampón borato salino al 0,9% a pH 8 con albumina bobina al 0,2%.

### 3.2.A.9.- Purificación de proteínas marcadas

La separación de la proteína marcada del  $^{125}\text{I}$  libre se realizó por dos métodos distintos:

- Por dialisis en tubos Visking 8/32 ( $\phi=2,4$ ) a 4°C frente a tampón borato salino 0,9% pH 8 con albúmina sérica bobina al 0,2%. El liquido de dialisis se renovó cada 6 ó 8 horas, midiendo las cpm liberadas al medio.

- Por filtración en una columna de Shephadex G-25 equilibrada en tampón borato salino al 0,9% con albúmina bobina al 0,2%. Se recogieron fracciones de 1 ml y se detectaron las cpm en cada una de ellas, obteniéndose dos picos: el primero correspondió a la proteína marcada y el segundo al  $^{125}\text{I}$  libre.

En ambos casos, el porcentaje de  $^{125}\text{I}$  libre después de la separación se determinó por precipitación con ácido tricloroacético al 20%. Para ello, se tomaron 10  $\mu$ l de cada fracción y se añadieron 0,5 ml de tampón borato salino al 0,9% pH 8, albúmina bobina al 0,2% y 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20%. Se centrifugó durante 20 minutos a 1.400 xg y se leyeron las cpm en el precipitado y en el sobrenadante. Con este dato y el porcentaje de incorporación de  $^{125}\text{I}$  a la proteína, se calculó el rendimiento de la técnica.

La proteína marcada radiactivamente se pasó por una columna de Shephadex G-200, para examinar la posible agragación ó fragmentación debida al marcaje

### 3.2.A.10.- Preparación de Inmunoadsorbentes

Se prepararon dos tipos de inmunoadsorbentes= en función del soporte utilizado:

#### a) Shepharosa 4B activada con BrCn.-

De 6 a 15 g de Shepharosa 4B se lavaron alternativamente tres veces con una solución de CLH 0,001 M y otro tanto con una solución de carbonato sódico/bicarbonato sódico 0,1M pH 8 para eliminar el CLH. Se resuspendió en el mínimo volumen necesario de este último tampón y se añadió una solución de 10-15 mg de proteína a complejar por g de Shepharosa activada. La solución -- proteica se dializó previamente frente a tampón carbonato/bicarbonato 0,1M pH 8. La mezcla se incubó con agitación suave 2 horas a temperatura ambiente ó 18 horas a 4°C . A continuación se filtró= en un Buchner y se recogió el filtrado, determinando su concentra ción mediante espectroscopía de absorción ultravioleta. El precipitado se lavó repetidamente con tampón carbonato/bicarbonato -- 0,1M hasta que la D.O. del liquido de lavado recogido fue menor de 0.02. El liquido de lavado se concentró y se cuantificó la cantidad de proteína presente mediante un Folín para determinar el rendimiento de la técnica.

Para eliminar los grupos activos que se hubieron qu~~ed~~ado sin acoplar con la proteína, se incubó la shepharosa con una solución de Etanolamina 1M a pH 8, durante 2 horas a temperatura= ambiente. A continuación se hicieron tres series de lavados, alternando tampones de bajo y alto pH (acético/acetato 0.1 M pH 4 y borato salino 0,9% pH 8). Por último, se lavó dos veces más con - tampón carbonato/bicarbonato y se resuspendió en un pequeño volumen para proceder a empaquetar la columna.

#### b) Precipitación con Glutaraldehído.-

Se procedió según el método de Williams (189)

A 10 ml de suero humano normal dializado frente a - tampón fosfato salino 0.15 M pH 7,3 se le añadieron 1 ml de tampón fosfatos 1 M pH 7 y 3 ml de una solución acuosa al 12% de glutaralheido, para obtener una concentración final del 2,5% en el medio. La mezcla se agitó durante 20 minutos y se dejó reposar 3 horas a temperatura ambiente.

500 mg de proteína precipitada se homogeneizaron -- con 200 ml de tampón fosfatos 0,2 M pH 7,3, lavando varias veces la suspensión resultante con el mismo tampón. A continuación se - centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y a 1.400 xg y el precipitado se resuspendió en glicina -ClH 0,1 M pH 2,8, iniciándose una - nueva serie de lavados con este tampón. Por último se suspendió - de nuevo en tampón fosfatos 0,2 M pH 7 y se lavó hasta que la D.O del sobrenadante fue menor de 0.02.

El inmunoabsorbente se resuspendió en tampón fosfato salino 0,15 M pH 7,3 azida sódica al 0,05% y se guardó a 4°C hasta su utilización.

### 3.2.A.11.- Obtención del componente secretorio libre

Se realizó según el método de Underdown y col (1977) por cromatografía de afinidad (170).

#### a) Aislamiento de las proteínas de la leche.-

La leche humana obtenida 3 ó 4 días después del parto se centrifugó durante una hora a 5000 xg para separar la parte grasa del componente protéico.

#### b) Preparación del componente secretorio libre.-

Para su separación del suero se utilizó su afinidad por las inmunoglobulinas poliméricas, en este caso IgM.

50 ml del suero obtenido por centrifugación de la leche, se mezclaron con 450 ml de tampón fosfato/citrato 0,01 M - pH 6,8 y 125 mg de sulfato amónico ferroso para agregar la lactoferrina sérica presente y se incubaron dos horas a 4°C con agitación continua.

200 ml del suero diluido se incubaron con un inmunoabsorbente de shepharosa-IgM durante 3 horas a 4°C. La mezcla se-

se empaquetó en una columna de vidrio y se lavó exhaustivamente -- con tampón fosfato salino 0,15 M pH 7,3, hasta que la densidad óptica del líquido de lavado fue menor de 0,02.

La proteína adsorbida se eluyó con tampón fosfatos= 0,01M-SCNK pH 7 y se dializó frente a tampón fosfato salino 0,15M pH 7,3. Se concentró y se aplicó a una columna de shephadex G-200 superior. La pureza de la preparación se comprobó por electroforesis en acetato de celulosa e inmunodifusión doble frente a anti-sueros anti-componente secretorio, anti-lactoferrina, anti-IgA y anti-suero humano total.

En estas condiciones el componente secretorio preparado contenía trazas de lactoferrina pero no de IgA.

c) Marcaje del componente secretorio libre.-

1 mg de componente secretorio libre se marcó --- con 1 mCi de  $^{125}\text{I}$ K, según el método de Hunter y Greenwood, eliminándose el  $^{125}\text{I}$  libre por filtración en gel.

3.2.A.12.- Ultracentrifugación en gradiente de densidad

Los gradientes se prepararon en tubos de nitrato de celulosa con un volumen de 5 ml. Mediante un formador de --- 2,25 ml de capacidad, se estableció un gradiente de densidad con una solución inicial de sacarosa al 5% y una final al 40% disueltas en Tris-ClH 0,15 M pH 7,4. La preparación se realizó el mismo día de su utilización.

50  $\mu\text{l}$  del suero a ensayar diluido al 1/10 en el mismo tampón, se aplicaron cuidadosamente sobre la superficie del gradiente y se centrifugaron durante 16 horas a 4 °C con una ultracentrifuga Spinco SW-50-1. Terminada la centrifugación, los tubos se mantuvieron a 4°C y se extrajeron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  perforando el fondo del tubo con una aguja unida a un colector de fracciones, mediante un tubo de goma. A cada fracción se le añadieron -- 1,5 ml de tampón borato salino al 0,9% pH 8 y se diluyó adecuadamente para cuantificación de inmunoglobulinas por RIA.

Los marcadores utilizados en el gradiente fueron:



Albumina sérica bobina.....	4,5 S
IgG de conejo.....	7 S
Ig M humana.....	19 S

2 mg de cada una de las proteínas se disolvieron en 0,5 ml de tampón y se centrifugaron paralelamente a las muestras - en tubos independientes. La recolección de las fracciones se realizó de modo análogo, leyéndose por espectrometría a 280 nm la concentración de proteína.

Con estos datos, se construyó una recta patrón que relacionaba el número de fracción con el peso molecular, estableciéndose a que fracción correspondía cada coeficiente de sedimentación.

La linealidad del gradiente se chequeó por refractometría centrifugándose 0,5 ml de tampón en las mismas condiciones de las muestras. El porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones eluidas se determinó utilizando el bromonaftaleno como estandar.

### 3.2.B.- Cuantificación de inmunoglobulinas por radioinmunoanálisis (RIA)

Para la cuantificación de IgG, IgA e IgM se utilizó un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo, según la técnica descrita por López Trascasa y col. (1980) (102).

#### 3.2.B.1.- Obtención del antígeno

La IgA, IgG e IgM se obtuvieron de los sueros - de m-ielomas correpondientes, aislándose según los procedimientos anteriormente descritos en los apartados 3.2.A. 1, 2 y 3.

#### 3.2.B.2.- Marcaje de inmunoglobulinas con <sup>125</sup>I

Se procedió según el método de Hunter y Greenwood (1979) (79).

La cantidad de IgA e IgG fue de 25  $\mu$ g y la de IgM - de 50  $\mu$ g. (Ver apartado 3.2.A.8).

Alicuotas de cada proteína marcada se pasaron por - una columna de shephadex G-200 superfino para detectar la posible agregación ó fragmentación de las proteínas con el marcaje.

### 3.2.B.3.- Adsorción del suero de carnero y del suero de conejo frente a suero humano total

Para evitar las inespecificidades que pudieran producirse por reacción cruzada entre los determinantes antigénicos de la IgG de estos sueros con los de la IgG humana a valorar, se adsorbieron con un suero humano total precipitado con glutaraldehído al 2,5%.

Un volumen igual al ocupado por el inmunoadsorbente se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se centrifugó a 1.400 xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C para su posterior titulación.

El precipitado se lavó exhaustivamente con solución salina fisiológica hasta que la D.O. del líquido de lavado fue menor de 0.02. Se añadió 4 ml de tampón glicina-ClH 0,1 M pH 2,8 y se agitó 5 minutos a 4°C. El precipitado se lavó de nuevo con el mismo tampón y varias veces con tampón fosfato salino 0,15 M pH 7,3. De esta forma quedó preparado para una nueva utilización.

### 3.2.B.4.- Titulación del suero de carnero anti IgG de conejo

La titulación del segundo anticuerpo se realizó mediante una curva de precipitación entre el suero de carnero anti-IgG de conejo diluido al 1/2 en tampón borato salino al 0,9% pH 8 frente a distintas diluciones de suero de conejo utilizado como transportador en el RIA.

100  $\mu$ l de suero de carnero diluido se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y 16 horas a 4°C con 100  $\mu$ l de suero de conejo en un rango de diluciones establecido entre 1/1 y 1/200

en un volumen final de 0,4 ml de tampón.

El precipitado se lavó tres veces en el mismo medio diluyéndose con 1,5 ml de una solución de sosa 0,1 N y leyéndose la densidad óptica a 280 nm.

Se tomó como punto de equivalencia el inmediatamente anterior al de máxima precipitación.

#### 3.2.B.5.- Valoración del primer anticuerpo

Los antisueros comerciales anticadenas pesadas  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\mu$  fueron obtenidos en conejo. No mostraron actividad cruzada con los antígenos marcados con  $^{125}\text{I}$  cuando se ensayaron por inmunoelectroforesis e inmunodifusión doble. La precipitación sólo ocurría con el antisuero específico para cada antígeno.

La titulación del primer anticuerpo se ha definido como aquella dilución del mismo que se requiere en la mezcla de reacción para fijar el 50% del antígeno marcado en ausencia del antígeno frío.

Para hacer esta valoración, se incubaron alicuotas de 100  $\mu\text{l}$  de una serie de diluciones del primer anticuerpo que iban desde 1/100 hasta 1/400.000 con 100  $\mu\text{l}$  del antígeno marcado a la concentración fijada para el ensayo (10-20 ng) y 100  $\mu\text{l}$  del suero de conejo adsorbido a la dilución fijada en el apartado anterior. El antígeno unido al antisuero se separó del libre por precipitación con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, ya valorado.

En un papel semilogarítmico se representó el tanto por ciento de inmunoglobulina marcada precipitada en función de la dilución y se seleccionó como dilución óptima de trabajo aquella que precipitó entre un 40-50% de las cpm totales y apareció en la zona de máxima pendiente de la curva.

#### 3.2.B.6.- Potencia del suero de carnero anti-IgG de conejo

Se realizó por adicción de diluciones crecientes del

suero de conejo y del suero de carnero anti-IgG de conejo a una mezcla de reacción que contenía antisuero específico anti-cadenas pesadas y antígeno marcado en las proporciones fijadas en el apartado anterior.

Con esta prueba se determinó la dilución de suero de carnero capaz de precipitar el 50% de las cpm de partida y permitió utilizar una menor cantidad de suero anti-IgG de conejo en los ensayos.

### 3.2.B.7.- Realización del ensayo

Se utilizó como estandar de valoración un suero humano normal cuantificado para IgA, IgG e IgM por inmunodifusión radial en placas comerciales de Kallestad. El rango de concentración establecido para cada una de estas proteínas fue: 4,5 a ---- 10.000 ng/ml para la IgA e IgM y de 12 a 27.000 ng/ml para la IgG

Las diluciones del estandar y las muestras se realizaron con tampón borato salino al 0,9% pH 8 con albúmina al 0,2%.

El ensayo se llevó a cabo por incubación de 2 horas a temperatura ambiente de 100 µl del problema ó estandar con 100 µl del primer anticuerpo anti-cadenas pesadas correspondientes, acompañado del suero de conejo diluido en la proporción elegida.

100 µl del antígeno marcado (10-20 ng) se añadieron a la mezcla, incubándose otras 2 horas a temperatura ambiente. La separación de los complejos solubles se realizó por precipitación con 100 µl de suero de carnero anti-IgG de conejo en la proporción seleccionada, tras una última incubación de 2 horas a temperatura ambiente y 18 horas a 4°C.

Los precipitados se lavaron tres veces con tampón borato salino al 0,9% pH 8 con albúmina sérica bovina al 0,2% y contaron en un contador de radiaciones Y.

La curva estandar se obtuvo por presentación del -- tanto por ciento de precipitación frente a la concentración de -- IgA, IgG e IgM fría presentes en el ensayo. La concentración de -- inmunoglobulinas en los problemas se obtuvo por interpolación en --

la curva estandar del tanto por ciento de cpm precipitadas en el ensayo . Las condiciones del RIA permitieron medir concentracion en un rango de sensibilidad de 10 a 300 ng/ml.

#### 3.2.B.8.- Análisis de variables

Para tener certeza de la validez de las determinaciones efectuadas mediante el RIA, se analizaron los siguientes parámetros:

- Reproducibilidad interensayo a partir de varias curvas estandar provenientes de análisis distintos.

- Reproducibilidad intraensayo para muestras analizados el mismo día por sextuplicado.

- Efectos inespecíficos establecidos por tanto por ciento de precipitación obtenido cuando se añadía el segundo anticuerpo a una mezcla de incubación que carecía del primer anticuerpo.

- Análisis de afinidad del primer anticuerpo por el antígeno, mediante la realización de varias curvas estandar en presencia de diferentes concentraciones de antígeno marcado.

- Paralelismo entre diluciones, por análisis de las muestras a dos diluciones distintas.

- Análisis de sensibilidad fijando el rango de concentración mínima detectable en 10 ng/ml.

#### 3.2.C.- Cultivo de células mononucleares "in vitro"

##### 3.2.C<sub>1</sub>.- Preparación de linfocitos para su cultivo "in vitro"

##### 3.2.C<sub>1</sub>.1.- Obtención de linfocitos

En condiciones estériles se extrajeron 30 ml de sangre venosa, de los que 5 ml se coagularon para la obtención de suero y los 25 ml restantes se heparinizaron con 20 ui/ml de heparina/litio libre de conservantes. La sangre se diluyó al 1/2 en solución salina fisiológica a pH 7,3 y se centrifugó en un gra-

diente de densidad en Lymphoprep a una densidad de 1,077 g/ml, durante 20 minutos a 400 xg y a temperatura ambiente (16).

Las células mononucleares se recogieron de la interfase y se lavaron dos veces con solución de Hank, centrifugándose 10 minutos a 400 xg la primera vez y a 200 xg, la segunda. Se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido y se procedió a la identificación morfológica de los linfocitos en una cámara Neubauer Precisa, mediante microscopía óptica. El número total de células obtenido venía dado:

Nº cel. por campo x Vol. suspensión

Capacidad de la cámara ( $1/10^4$ )

Seguidamente se centrifugó la suspensión durante 10 minutos a 200 xg y las células se llevaron a una concentración final de  $10 \times 10^6$  cel/ml de medio de cultivo enriquecido, más un 10% de suero de ternera fetal descomplementado.

El sobrenadante del último se guardó y se comprobó la ausencia de inmunoglobulinas por RIA.

### 3.2.C<sub>1</sub>.2.- Viabilidad celular

Se calculó por la prueba de exclusión del azul tripán. Tal como se ha descrito la técnica de aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica, siempre fue superior a un 98%.

El test se realizó mezclando a partes iguales un volumen de una solución de azul tripán previamente preparada con otro de la suspensión celular. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se contaron las células teñidas antes de que transcurrieran 5 minutos desde el inicio de la tinción. La viabilidad se estableció restando al número de células totales contadas, aquellas que adquirieron un color violeta.

### 3.2.C<sub>1</sub>.3.- Preparación de hematíes de carnero

Se extrajeron 10 ml de sangre de carnero en condiciones estériles y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.400 xg con el fin de separar los hematíes del plasma. Las células se lavaron tres veces con una solución fisiológica a pH 7,2 y se llevaron a una concentración del 2 % en el mismo medio. Se incubaron 25 minutos a 37°C con 15 ui/ml de Neuraminidasa, con el fin de sensibilizar por desialización la pared de los hematíes. Seguidamente se centrifugaron 5 minutos a 1.400 xg y se lavaron de nuevo tres veces con solución salina fisiológica resuspendiéndose a una concentración final de un 2% en el mismo medio (54).

3.2.C<sub>1</sub>.4.- Preparación del suero de ternera fetal adsorbido

Para evitar las interacciones inespecíficas en la separación de células entre la membrana del eritrocito y el suero de ternera fetal, se mezclaron el suero y las células en una proporción de 4 a 1. Se incubaron dos horas a 4°C con agitación esporádica y se centrifugaron durante 5 minutos a 200 xg, recoigiéndose el suero de ternera fetal.

3.2.C<sub>1</sub>.5.- Formación de rosetas espontáneas

En tubos estériles de 10 ml se mezclaron (54)

- 1,5 ml de hematíes de carnero al 2%, lavados y -- tratados con Neuraminidasa.
- 0,75 ml de suero de ternera fetal adsorbido.
- 0,75 ml de células mononucleares a una concentración de  $10 \times 10^6$  cel./ml.

Se centrifugaron 6 minutos a 100 xg y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.2.C<sub>1</sub>.6.- Aislamiento de linfocitos T y poblaciones no-

T

Las células formadoras de rosetas espontáneas ó ce-

lúlas T se separaron de las no formadoras de rosetas mediante un gradiente de densidad.

Sobre 3 ml de Lymphoprep se depositó cuidadosamente la suspensión de rosetas y se centrifugó a 25 minutos a 400 xg. - De la interfase se recogió una población rica en células B. Del fondo se obtuvieron los linfocitos T previo tratamiento durante 15 minutos con una solución de  $\text{ClNH}_4$  con el fin de lisar los hemáties. Ambas poblaciones se lavaron por separado dos veces con solución de Hank, primero 10 minutos a 400 xg y después 10 minutos a 200 xg. Se resuspendieron en medio de cultivo enriquecido y se procedió al conteo celular. Se comprobó la viabilidad por la prueba de exclusión de azul Tripán. Según esta técnica la viabilidad celular siempre fue mayor de un 95%.

La riqueza de estas poblaciones se determinó por rosetas espontaneas e inmunoglobulinas de superficie.

### 3.2.C<sub>1</sub>. 7.- Inmunoglobulinas de superficie

Las inmunoglobulinas de superficie son marcadores de superficie específicos de linfocitos B (126).

Se tomaron 0,1 ml de la suspensión de linfocitos a una concentración de  $10 \times 10^6$  cel/ml y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con una dilución 1/10 elegida previamente de un antisuero anti-inmunoglobulinas humanas, marcado con fluoresceína. Se lavan dos veces con solución de Hank, se depositaron sobre un portaobjetos y se leyeron en un microscópio de fluorescencia. El porcentaje de células que portan inmunoglobulinas en su superficie se expresó como:

$$\frac{\text{Nº de cel. Flur}^+}{\text{Nº total de cel.}} \times 100$$

### 3.2.C<sub>1</sub>.8.- Rendimiento de la técnica

Alicuotas de ambas preparaciones de células=



T y no-T se sometieron a formación de rosetas espontáneas y determinación de inmunoglobulinas de superficie.

Sobre un porta teñido de azul de toluidina se depositó una gota de la suspensión de rosetas y se mezcló hasta que adquirió un color azulado. La preparación se llevó a una cámara Neubauer y se contó el número de rosetas con respecto al de linfocitos totales. Sólo se consideraron rosetas positivas, aquellos -- linfocitos rodeados de al menos tres hematíes.

Por la técnica descrita en estos apartados, el porcentaje de rosetas en el caso de la suspensión de células T fue mayor de un 95% y en el caso de la suspensión de células enriquecida en células B, menor de un 2%. El número de células inmunoglobulinas de superficie<sup>+</sup> en esta última suspensión estaba comprendido entre un 60-80 %, siendo el porcentaje menor de un 2% en el caso de las células formadoras de rosetas.

### 3.2.C<sub>2</sub>- Síntesis de inmunoglobulinas y células implicadas

#### 3.2.C<sub>2</sub>.1.- Síntesis de inmunoglobulinas

La suspensión de células mononucleares obtenidas de sangre periférica se llevaron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  cel/ml de medio enriquecido, más un 10% de suero de ternera fetal. Alicuotas de la preparación se incubaron en microplacas de cultivo durante 7 días en presencia y ausencia de 10  $\mu$ l/ml de PWM (mitógeno Pokeweed), mitógeno inespecífico estimulador de la síntesis de inmunoglobulinas, en las condiciones habituales de cultivo.

El contenido de los pocillos se recogió y centrifugó a 200 xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes se guardaron a -20°C para detección de inmunoglobulinas por RIA, según el método descrito (3.2.B). Las células se utilizaron para la detección de receptores para el componente secretorio y caracterización de poblaciones de células T, mediante anticuerpos monoclonales.

3.2.C<sub>2</sub>.2.- Formas moleculares de la IgA producida "in vitro".

Las formas moleculares de IgA producidas "in vitro" se caracterizaron según el método de Kutteth (92) por filtración en gel a pH 7,3.

Los sobrenadantes aislados del cultivo celular tras 7 días de incubación con PWM y cuantificados por RIA, se dializaron durante 18 horas frente a tampón fosfato salino 0,15 M pH 7,3

2 ml del dializado se cromatografiaron en una columna de Ultrogel ACA-22, equilibrada en el mismo tampón. La columna se calibró previamente. Los marcadores utilizados fueron: azul de trano ( peso molecular mayor de  $2 \times 10^6$  D), ferritina (450.000), aldolasa (150.000) y albúmina bovina (68.000).

Se recogieron fracciones de 2 ml de volumen y la presencia de IgA se detectó por RIA.

3.2.C<sub>2</sub>.3.- Caracterización bioquímica de la IgA producida "in vitro".

Para tratar de caracterizar las formas moleculares obtenidas en el cultivo celular, se realizaron tres grupos de experiencias:

a) Filtración en gel a pH 4,1.-

Para determinar si en la elución a pH 7,3 hubieran podido obtenerse falsos porcentajes de distribución, bien por la presencia de agregados ó uniones inespecíficas de otro tipo, 2 ml de los sobrenadantes se dializaron 18 horas frente a tampón acético/acetato 0,1 M pH 4,1. Se cromatografiaron en una columna de Ultrogel ACA-22 calibrada y equilibrada en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 2 ml. La presencia de IgA se detectó por RIA.

b) Reducción y alquilación

Para determinar la presencia de verdaderos polímeros de IgA, alícuotas de los sobrenadantes se dializaron --

frente a tampón tris-ClH 0,2M EDTA 20mM a pH 8,6. 2 ml del dializado se incubaron durante 1 hora a 37°C con 20 µl de una solución 10 mM de Ditiotreitól y 15 minutos a 4°C con 20 µl de Iodoacetamida 21 mM, en ausencia de luz. La muestra se aplicó a una columna de ACA-22 calibrada y equilibrada en el mismo tampón, recogiendo fracciones de 2 ml. La IgA presente se cuantificó por RIA.

c) Afinidad por el componente secretorio.-

Se realizó por el método de Brandtzaeg -- (1974), Crago y Mestecky (1979), parcialmente modificado por Lopez Trascasa (1980).

La IgM presente en los sobrenadantes del cultivo se eliminó por incubación durante 1/2 hora a temperatura ambiente con agitación continua, con un inmunoabsorbente de shepharosa unida a una anti-IgM, para evitar la interacción entre el componente secretorio y esta inmunoglobulina de carácter polimérico.

Alicuotas del sobrenadante adsorbido y previamente cuantificadas para IgA, se incubaron con  $^{125}\text{I}$ -CS a una relación molar de 1/7,5 durante hora y media a temperatura ambiente. Las muestras se ultracentrifugaron en gradiente de densidad, según el procedimiento descrito. Se midió la radiactividad presente en cada una de las fracciones obtenidas y la presencia de IgA se localizó por RIA.

Paralelamente se establecieron los controles por incubación del  $^{125}\text{I}$ -CS con IgA monomérica y polimérica en las mismas condiciones.

3.2.C<sub>2</sub>.4.- Receptores celulares para el componente secretorio

Se analizaron mediante una técnica de inmunofluorescencia doble indirecta (18, 30, 39, 101).

a) Receptores citoplasmáticos para el componente secretorio en linfocitos en cultivo

Las células mononucleares extraídas de un cultivo --

tras 7 días de incubación en presencia de PWM, se lavaron con solución de Hank dos veces: 10 minutos a 350 xg la primera y a 150 xg la segunda. Se suspendieron en medio de cultivo enriquecido y se procedió a su contaje. Se ensayó su viabilidad, comprobándose que era superior a un 70%. Finalmente se llevaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/100  $\mu$ l y se depositaron sobre un porta dejándose secar. Se fijaron con una solución de etanol al 95% y acético al 5%.

Las placas se lavaron con solución tampón fosfato-salino 0.15 M pH 7,3, azida al 0,05%, renovando el medio a intervalos de 5 minutos durante un cuarto de hora. En cámara húmeda, se incubaron durante una hora con 100  $\mu$ l de componente secretorio libre (200  $\mu$ g), lavándose tres veces de nuevo de forma análoga a la anterior. La cantidad de componente secretorio utilizado se determinó por ensayos previos.

La presencia de componente secretorio en el citoplasma celular se detectó con un antisuero comercial anti-componente secretorio marcado con Rodamina. Para evitar uniones inespecíficas, el antisuero se adsorbió con un inmunoabsorbente de shepharosa-IgA, IgG y cadenas ligeras de ambos tipos. Su pureza y especificidad se comprobó por inmunolectroforesis e inmunodifusión doble frente a los antisueros correspondientes a estas proteínas y a ellas mismas y un antisuero anti-componente secretorio humano. 100  $\mu$ l del antisuero adsorbido se incubaron a una dilución 1/10 previamente elegida, durante 1/2 hora a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda.

La detección de la clase de inmunoglobulina receptora del componente secretorio se realizó mediante un antisuero que contenía los fragmentos  $F(ab')_2$  de los anticuerpos anti-IgA, IgG e IgM respectivamente, marcados con fluoresceína. Cada placa se incubó con 100  $\mu$ l del antisuero correspondiente diluido al 1/10 durante media hora y en las condiciones ya descritas.

Una vez lavadas y secas, las placas se prepararon para contar por dos observadores distintos.

La especificidad de la tinción se determinó adsorbiendo los antisueros marcados con el inmunógeno correspondiente y por bloqueo de la tinción de fluorescencia con el antisuero sin -

marcar.

Los porcentajes de unión del componente secretorio a las células se establecieron por el cociente entre:

$$\frac{\text{Nº de cel (Rod-Fluor)}^+}{\text{Nº de cel. Fluor.}^+}$$

b) Inmunoglobulinas de superficie y receptores para el componente secretorio

Los linfocitos aislados del cultivo después de lavados, contada y ensayada su viabilidad, se suspendieron en solución de Hank con azida sódica al 0,05% a una concentración final de  $2 \times 10^6$  cel/100  $\mu$ l de solución.

100  $\mu$ l de la suspensión celular se incubaron en un tubo de ensayo durante una hora con 100  $\mu$ l de componente secretorio libre (200  $\mu$ g) a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron tres veces con solución Hank con azida, por centrifugación a 200 xg, 5 minutos. A continuación se incubaron con 100  $\mu$ l de suero anticomponente secretorio marcado, media hora a temperatura ambiente.. Una vez eliminada la rodamina, se trataron de nuevo con 100  $\mu$ l en las mismas condiciones, con antisueros que contenían los fragmentos  $F(ab')_2$  de los anticuerpos anti-IgA, IgG e IgM marcados con fluoresceína a una dilución 1/10 en presencia de azida.

Las células lavadas y suspendidas en solución de Hank se depositaron sobre un porta y se prepararon para contar. El recuento se efectuó por dos observadores independientes y antes de que la placa se secase para evitar falsos positivos.

La especificidad de la tinción y los tantos por ciento de células que portaban componente secretorio y una clase determinada de inmunoglobulina se determinaron de forma análoga a la descrita en el apartado anterior.

3.2.C<sub>2</sub>.5.- Síntesis de inmunoglobulinas en presencia de=

#### suero anti-cadena J humana

Se utilizó una modificación del método descrito por Richard Warrington (1981). (175)

El antisuero anti-cadena J humana obtenido en conejo fue previamente adsorbido frente a un suero humano total precipitado con glutaraldehído para eliminar las posibles reacciones cruzadas que pudieran establecerse. Diluciones crecientes del antisuero adsorbido: 1/15, 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, = 1/1920 fueron incubadas durante 7 días en las condiciones habituales de cultivo, con células mononucleares frescas obtenidas de -- sangre periférica a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml y en presencia de 10  $\mu$ l/ml de PWM.

Los sobrenadantes se cuantificaron para IgA, IgG e IgM, mediante un radioinmunoensayo.

#### 3.2.C<sub>2</sub>.6.- Detección de la cadena J en el citoplasma de linfocitos cultivados "in vitro"

Se utilizó una modificación del método de Messtecky (1980) (110).

Las células obtenidas de un cultivo tras 7 días de incubación con PWM se lavaron y suspendieron en solución de Hank a una concentración de  $10 \times 10^6$  cel/ml previo ensayo de su viabilidad. Aliquotas de 100  $\mu$ l se fijaron sobre los portas con una solución de etanol al 95% y acético al 5%, rehidratándose a continuación por lavados sucesivos con tampón fosfato-salino 0,15 M pH -- 7,3. Las placas se trataron con 100  $\mu$ l de suero anticadena J humana adsorbido frente a un suero humano total precipitado con glutaraldehído, durante 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Eliminado el antisuero, se incubaron con 100  $\mu$ l de un suero anti-IgG de cabra obtenido en conejo marcado con rodamina y diluido al 1/10. Este suero fue previamente adsorbido frente a suero humano total precipitado con glutaraldehído para evitar reacciones cruzadas entre la IgG humana y el antisuero. Tras media hora de -

incubación y varios lavados, las células se trataron finalmente - con 100  $\mu$ l de sueros diluidos al 1/10 que contenían los fragmen-- tos F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos anti-IgA, IgG e IgM, marcados con fluoresceína.

El conteaje se realizó antes de que se secasen las - placas y por dos observadores independientes.

La especificidad de la tinción y los porcentajes - de células cadena-J<sup>+</sup> se establecieron tal y como se ha descrito - en los apartados anteriores.

### 3.2.C<sub>3</sub>.- Factores implicados en la regulación de la síntesis de-- inmunoglobulinas "in vitro"

#### 3.2.C<sub>3a</sub>.- Factores Celulares

##### 3.2.C<sub>3a</sub>.1.- Generación de células supresoras mediante la activación de la concanavalina A.-

La generación de células supresoras en cultivo se en sayó según el método de Miller (113). Las células mononucleares - aisladas de sangre periférica y llevadas a una concentración de -  $2 \times 10^6$  cel/ml de medio de cultivo enriquecido más un 10% de suero= de ternera fetal, se cultivaron en presencia de 10  $\mu$ l/ml de PWM y concentraciones variables de Con A, mitógeno estimulador de linfo citos T: 1,25  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50 -  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml en las condiciones habituales de cultivo.

Después de 7 días de incubación se recogieron los a brenadantes, detectándose la producción de inmunoglobulinas por - RIA. Los niveles de generación de células T se midieron por cuanti ficación de poblaciones reguladoras, mediante anticuerpos monoclo nales específicos.

##### 3.2.C<sub>3a</sub>.2.- Cultivo mixto de células mononucleares "in vi tro"

Las células mononucleares de pacientes que -

presentaron un comportamiento anormal en el ensayo anterior y de individuos control (48), a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y en atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$ , con  $50 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$  y  $2,5 \mu\text{g/ml}$  de Con A. Al cabo de 48 horas se lavaron dos veces con una solución  $0,3 \text{ M}$  de  $1\text{-O metil-}\alpha\text{-D glucopiranosido}$  para eliminar los restos de lectina de la membrana celular y se suspendieron en medio de cultivo. Una vez ensayada su viabilidad y contadas se llevaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml.

Células frescas de controles y pacientes alogénicos se prepararon a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml. Las células pretratadas con Con A se cultivaron con las células frescas alogénicas a una relación molar de  $1/1$  en presencia de  $10 \mu\text{l/ml}$  de PWM y en condiciones habituales.

Los controles de la experiencia se establecieron co-cultivando paralelamente células pre-cultivadas 48 horas sin Con A con células frescas en presencia de PWM.

### 3.2.C<sub>3a</sub>.3.- Co-cultivo de poblaciones de células T y no-T

Las células frescas obtenidas de sangre periférica por centrifugación en gradiente de densidad, se trataron con hematíes de carnero al 2% sensibilizados con neuraminidasa, según se ha descrito ya y se incubaron durante hora y media a temperatura ambiente.. Las células formadoras de rosetas se separaron de las no formadoras por centrifugación en gradiente de densidad.

La población de células no-T recogida de la interfase y lavadas se llevaron a una concentración  $2 \times 10^6$  cel/ml en medio de cultivo enriquecido más un 10% de suero de ternera fetal. Igualmente se hizo con la población de células T, tras la lisis de los hematíes con una solución de  $\text{ClNH}_4$  al 0,98%. La pureza de ambas preparaciones se determinó por inmunoglobulinas de superficie y formación de rosetas.

$2 \times 10^5$  células T de pacientes y controles se incubaron con una proporción igual de células enriquecidas en B de con-



troles y pacientes alogénicos respectivamente, en presencia de PWM y en las condiciones habituales de cultivo. (115)

Al cabo de 7 días se recogieron los sobrenadantes, = cuantificándose por radioinmunoensayo, la cantidad de IgA, IgG e IgM producida.

3.2.C<sub>3a</sub>.4.- Cuantificación de células T reguladoras de la síntesis de inmunoglobulinas en vitro, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos

La cuantificación se realizó según el método de Reinherz (1980).

Las células frescas separadas de sangre periférica y las cultivadas en presencia de PWM y de PWM más Con A, se aislaron según el procedimiento habitual y se llevaron a una concentración de  $10 \times 10^6$  cel/ml de medio de cultivo enriquecido con azida al 0,05%.

Alicuotas de 100 µl se incubaron durante una hora a 4°C con 5 µl de los antisueros que contenían anticuerpos monoclonales obtenidos en ratón, anti-receptores específicos de linfocitos T totales (OKT-3<sup>+</sup>), de linfocitos T cooperadores (OKT-4<sup>+</sup>) y linfocitos T citotóxicos/supresores (OKT-8<sup>+</sup>) humanos, respectivamente.

Transcurrido este tiempo, se añadió un ml de solución de Hank fría con azida al 0,05% y se centrifugaron 5 minutos a 200 xg. La operación se repitió dos veces.

Las células lavadas se incubaron de nuevo con 100 µl de un antisuero fluoresceinado, que contenía los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra, durante media hora a 4°C.

Una vez eliminada la fluorescencia y suspendidas en 100 µl de solución Hank con azida, se prepararon para contar por dos observadores independientes.

La especificidad de la tinción se determinó incubando el antisuero fluoresceinado con células no tratadas con los anti

cuerpos monoclonales. El grado de inespecificidad fue menor de un 2%.

### 3.2.C<sub>3b</sub>.- Factores séricos

#### 3.2.C<sub>3b</sub>.1.- Efecto del suero de los pacientes con nefropatía de IgA sobre la síntesis normal de inmunoglobulinas "in vitro"

Las células mononucleares de individuos control se llevaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml de medio de cultivo enriquecido, más un 10% de suero de ternera fetal.

Paralelamente se extrajeron 5 ml de sangre venosa de un grupo de 5 pacientes que presentaban claramente alteraciones de regulación y de los controles utilizados en la experiencia. El suero se separó por centrifugación del coágulo y se diluyó al 1/10 en solución de Hank.

100  $\mu$ l del suero diluido de pacientes y controles se incubaron con  $2 \times 10^6$  células control durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células una vez lavadas, contadas y ensayada su viabilidad, se resuspendieron de nuevo a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml de cultivo y se cultivaron en presencia de 10  $\mu$ l de PWM según el procedimiento habitual.

Al cabo de 7 días se recogieron los sobrenadantes y se detectó la producción de inmunoglobulinas por RIA. las células se cuantificaron mediante anticuerpos anti-receptores específicos de linfocitos T reguladores.

#### 3.2.C<sub>3b</sub>.2.- Efecto del suero de los pacientes con nefropatía de IgA sobre la generación de células supresoras en cultivo

Parte de las células control tratadas con el suero de pacientes y controles alogénicos, tal como se ha descrito en el apartado anterior se incubaron durante 7 días en presencia de PWM y 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml y 2.5  $\mu$ g/ml de Con A respectivamente a 37°C y atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

La producción de inmunoglobulinas se detectó por - RIA. La generación de células T reguladoras en función de la dosis de Con A se determinó mediante los anticuerpos monoclonales específicos de linfocitos T reguladores.

3.2.C<sub>3b</sub>.3.- Efecto de los agregados de IgA monomérica, - IgA polimérica e IgG, así como de estas proteínas, sobre la síntesis y la actividad de células supresoras en cultivo

- Agregación de proteínas.-

Las fracciones monoméricas y poliméricas de la IgA obtenidas según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.A.3., se agregaron por calentamiento a 60°C durante una hora y media. El grado de agregación se determinó por filtración en Ultrogel ACA-22 y se seleccionaron para estas experiencias aquellas fracciones correspondientes a un tamaño molecular comprendido entre  $(1-2) \times 10^6$  D. La proteína agregada se concentró y cuantificó por inmunodifusión radial.

En el caso de la IgG humana, la agregación sólo requirió media hora de calentamiento a 60°C. El grado de agregación fue mayor que en el caso de la IgA y se seleccionaron para trabajar los agregados comprendidos entre  $(1-2) \times 10^6$  D de peso molecular.

- Realización del ensayo.-

Se aislaron células mononucleares de individuos control y se llevaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml de medio de cultivo enriquecido, más un 10% de suero de ternera fetal. Alicuotas de esta preparación se incubaron con una concentración final de 250 µg/ml de cada uno de los agregados proticos y sus correspondientes proteínas. Al cabo de 2 horas, las células se lavaron con solución de Hank hasta eliminar la proteína del medio y se suspendieron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml de cultivo. A continuación se cultivaron durante 7 días a 37°C y en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, en presencia de 10 µl/ml de PWM y concen-

- 83 -

traciones variables de Con A: 50  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (185)

La detección de inmunoglobulinas en los sobrenadantes se realizó por radioinmunoanálisis.



83<sup>2</sup>

# RESUL- TADOS

#### 4.- RESULTADOS

##### 4.1.- Síntesis de inmunoglobulinas "in vitro"

##### 4.1.A.- Estudio de la síntesis de inmunoglobulinas por las células mononucleares obtenidas de sangre periférica.

Con objeto de determinar si los elevados niveles de IgA sérica presentados por los pacientes con nefropatía de IgA podría deberse a un aumento en la síntesis de esta inmunoglobulina, se estudió la producción de IgA, IgG e IgM "in vitro", mediante cultivo de linfocitos obtenidos de sangre periférica.

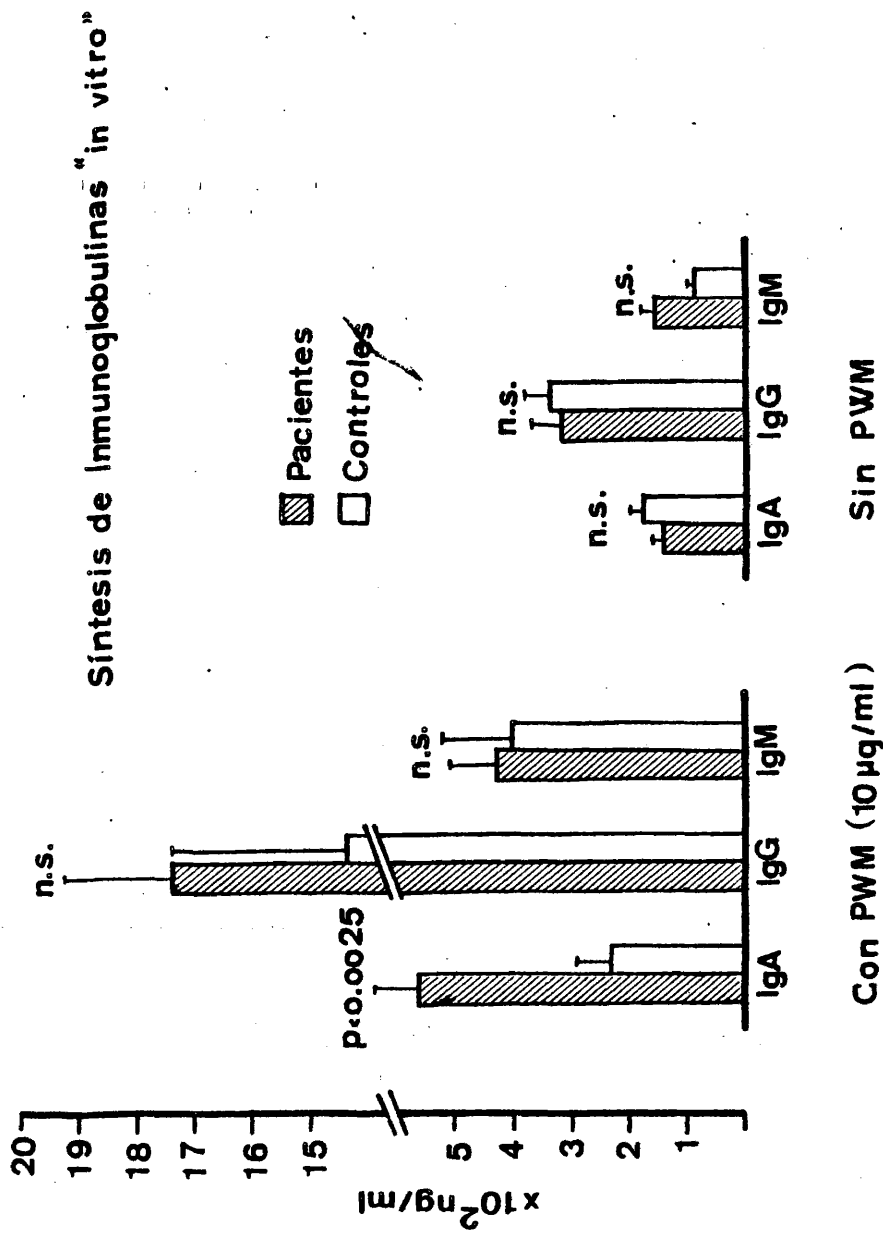
En ausencia del estímulo policlonal del mitógeno Pokeweed no había diferencias significativas en la producción de inmunoglobulinas entre el grupo de pacientes y controles (Fig. 9). En presencia del PWM, la producción de IgA fue significativamente mayor ( $p < 0.0025$ ) en pacientes ( $560 \pm 97$  ng/ml) en relación al mismo grupo control ( $231 \pm 57$  ng/ml). No hubo diferencias entre las cantidades de IgG e IgM sintetizadas por ambos grupos.

##### 4.1.B.- Estudio de las características bioquímicas de la IgA producida en cultivo.

En un grupo de pacientes y controles se estudiaron los porcentajes de distribución de IgA de alto peso molecular producida "in vitro", tras la estimulación con PWM y sus características bioquímicas.

##### 4.1.B.1.- Formas moleculares producidas in vitro

Los sobrenadantes obtenidos después de 7 días de cultivo en presencia de PWM y dializados frente a tampón fosfato-salino 0.15 M pH 7,3, se cromatografiaron en una columna de ultragel ACA-22, equilibrada y calibrada en el mismo tampón. Se obtuvo en ambos casos un perfil de elución bifásico (Fig. 10A). La pro-



- Fig.- 9-



porción de IgA eluida en una zona correspondiente a una IgA de alto peso molecular (600.000-250.000 D) era elevada, siendo el porcentaje obtenido en esta región significativamente más alto en el grupo de pacientes (Fig. 11A), presentando los controles la misma situación en la región comprendida entre (250.000-100.000) D, propia de la IgA monomérica.

En todos los casos, se obtuvo una pequeña cantidad de IgA de alto peso molecular (10%) en el volumen de exclusión, que representaría un grupo de agregados inespecíficos de IgA, formados en la manipulación de las muestras (8') (Fig. 10A).

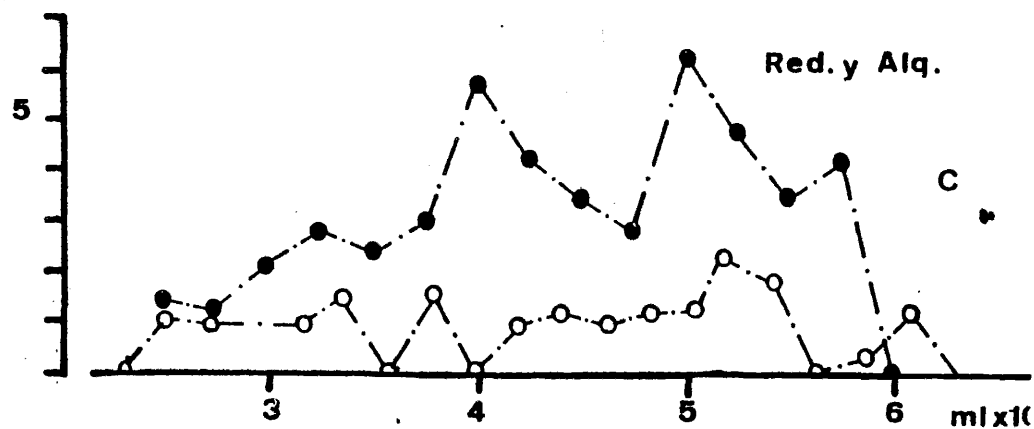
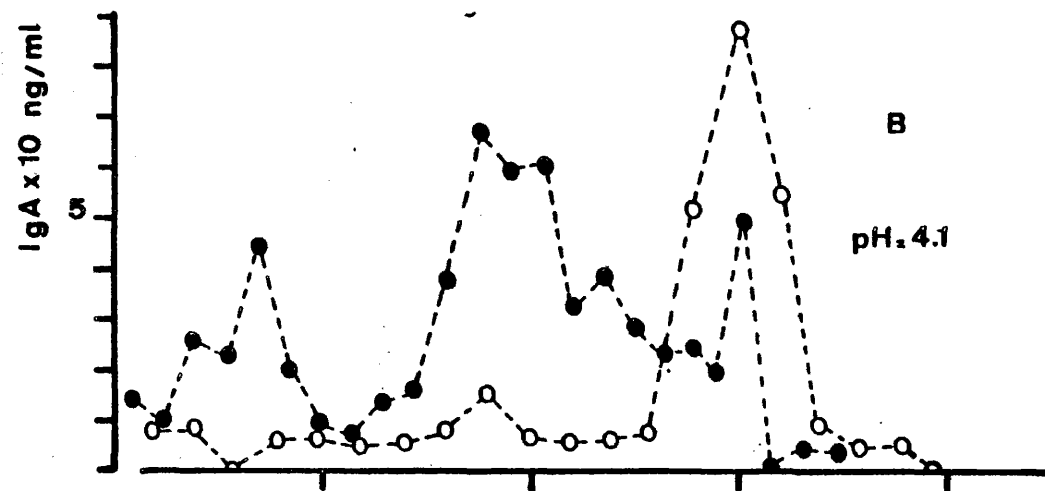
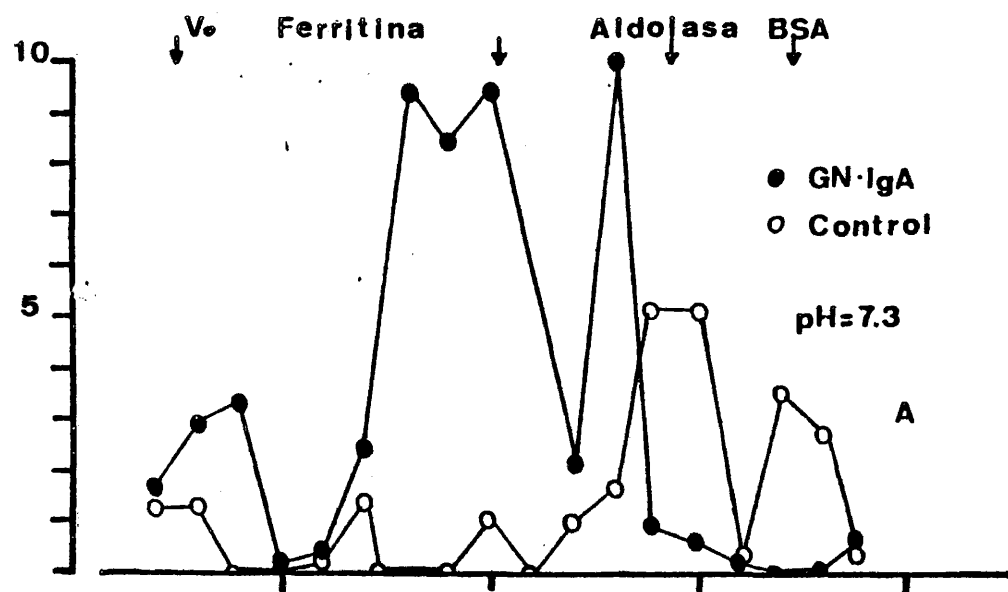
#### 4.1.B.2.- Caracterización bioquímica de la IgA producida "in vitro".

Para determinar si la IgA de alto peso molecular sintetizada en presencia de PWM era realmente IgA polimérica ó se trataba de agregados de pequeño tamaño formados en el proceso de manipulación de las muestras, se realizaron tres grupos de experiencias que proporcionaron los siguientes resultados:

a) No se produjeron cambios en los porcentajes de distribución de IgA comprendida en la zona de peso moleculares entre (600.000-250.000) D, tras el tratamiento y cromatografía de los sobrenadantes a pH 4,1. En la figura 10B y 11B se recogen estos resultados que están de acuerdo con la estructura covalente de la IgA polimérica.

b) La reducción y alquilación de los sobrenadantes previa a la cromatografía proporcionó el perfil recogido en la figura 10C, produciéndose un desplazamiento de la IgA hacia formas moleculares de menor tamaño. El porcentaje de formas de alto peso molecular disminuyó significativamente en relación al obtenido por cromatografía a pH 7,3 (Fig. 11C) y aumento significativamente en el caso de las formas monoméricas y componentes de bajo peso molecular, con relación a la misma situación

En la fig. 10 se han representado los perfiles de --



elución de un paciente con nefropatía de IgA (625 ng/ml IgA "in vitro") y un control (210 ng/ml "in vitro"), como caso más representativo de la distribución de las formas moleculares de IgA en cultivo y su estabilidad frente a los diferentes tratamientos químicos.

c) La naturaleza polimérica de la IgA producida "in vitro" se determinó finalmente mediante un ensayo de afinidad por el componente secretorio aislado de calostro humano, según el método descrito por Brandtzaeg (19), parcialmente modificado (193).

La IgM presente en los sobrenadantes y que podría interferir con el ensayo dada su capacidad de unión al componente secretorio, se eliminó por incubación con un inmunoabsorbente de shepharosa unida a un suero anti-IgM humana obtenido en conejo, en exceso de anticuerpo, tal como se ha descrito en el apartado 3.2.1.10., durante dos horas a temperatura ambiente.

Las fracciones eluidas a pH 7,3 y correspondientes a cada uno de los tres picos obtenidos por filtración en gel, se incubaron con el  $^{125}\text{I}$ -CS. Los complejos formados se separaron del  $^{125}\text{I}$ -CS libre por ultracentrifugación en gradiente de densidad, entre un 5-40% de sacarosa, midiéndose las cpm en cada una de las fracciones recogidas (193).

Solamente la IgA comprendida en la región de alto peso molecular (2º pico de la Fig. 10A) fue capaz de unir un 40% del  $^{125}\text{I}$ -CS, porcentaje similar al hallado para la IgA polimérica purificada del suero de estos pacientes (126) y la IgA polimérica obtenida a partir de mielomas de IgA (19).

Estos resultados sugieren que la IgA pesada encontrada en los sobrenadantes del cultivo tras 7 días en presencia de PWM es realmente polimérica, manteniendo los pacientes con nefropatía de IgA una proporción significativamente mayor de esta forma molecular que los sujetos control.

#### 4.1.C.- Análisis de los receptores celulares para el componente secretorio sobre los linfocitos estimulados con PWM

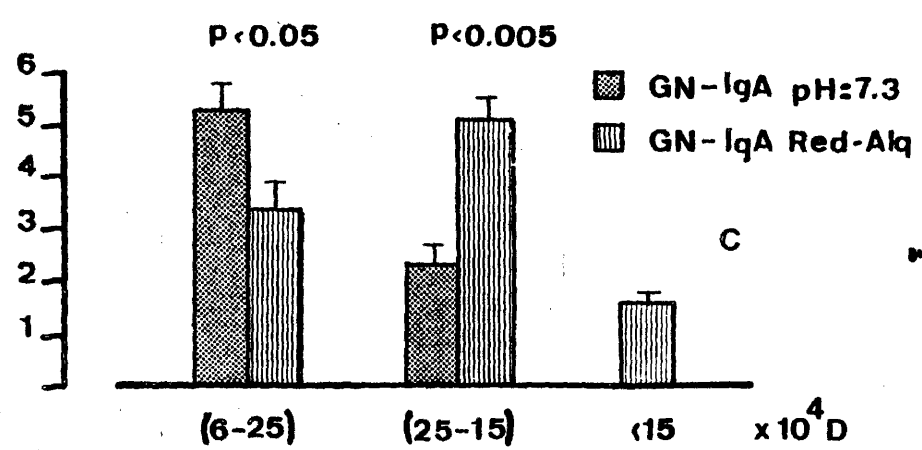
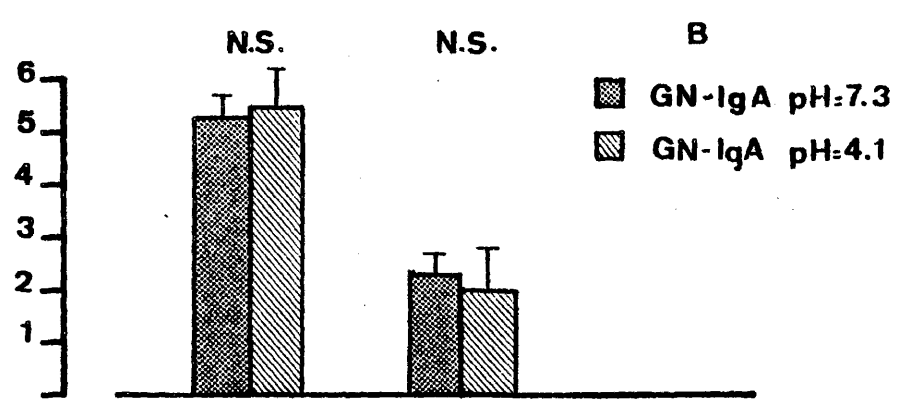
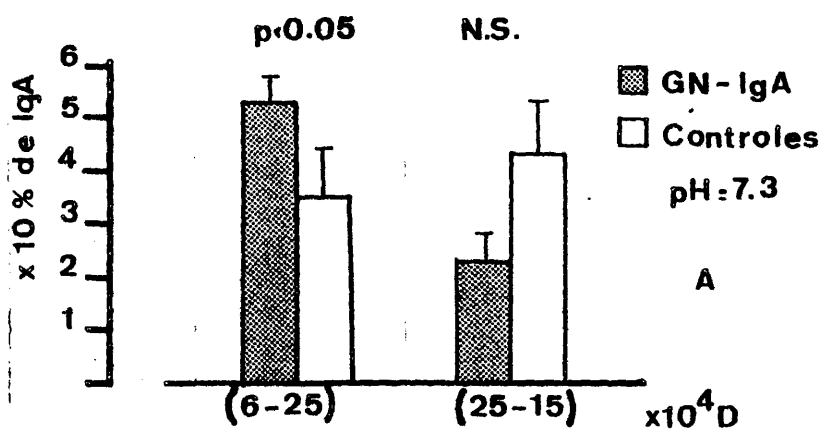


Fig.- 11

El aumento de la síntesis de IgA en cultivo de pacientes con nefropatía de IgA, así como el aumento en la proporción de la fracción polimérica en respuesta a la estimulación policlonal, llevó a suponer un trastorno cuantitativo de la proliferación de linfocitos B responsables de la síntesis de esta inmunoglobulina.

Para estudiar este punto se analizó la interacción del componente secretorio con las inmunoglobulinas de superficie e intracitoplasmáticas de los linfocitos extraídos de un cultivo tras 7 días de incubación con PWM.

#### 4.1.C.1.- Inmunoglobulinas de superficie y receptores para el componente secretorio

Los ensayos de inmunofluorescencia doble in directa revelaron un porcentaje mayor de células que transportaban IgA en su superficie en los pacientes en relación a los controles ( $5.60 \pm 1.53$  versus  $3.28 \pm 1.53$  respectivamente), como puede apreciarse en la figura 12. Los niveles de células portadoras de IgG e IgM no presentaban esa diferencia entre ambos grupos, siendo el aumento específico para la población responsable ó implicada en la síntesis de IgA.

Estos resultados están de acuerdo con el aumento en los niveles de esta inmunoglobulina producidos tras estimulación inespecífica en cultivo.

La unión del componente secretorio ó CS a las inmunoglobulinas de superficie fue menor de un 3%, correspondiendo la mayor parte a linfocitos portadores de IgM, en el caso de los controles ( $0.84 \pm 0.25$ ). En los pacientes, la unión del CS fue mayor aunque la diferencia no era significativa ( $5.73 \pm 2.25$ ) con respecto a los controles, correspondiendo la mayor parte a células portadoras de IgA ( $1.18 \pm 0.53$  frente a  $0.44 \pm 0.27$  en controles). En consecuencia la proporción de células portadoras de IgA polimérica frente a las portadoras de IgA total, también era significativamente mayor ( $20.74 \pm 5.69$  versus  $13.46 \pm 2.44$ )

# INMUNOGLOBULINAS de SUPERFICIE

sobre LINFOCITOS estimulados con PWM

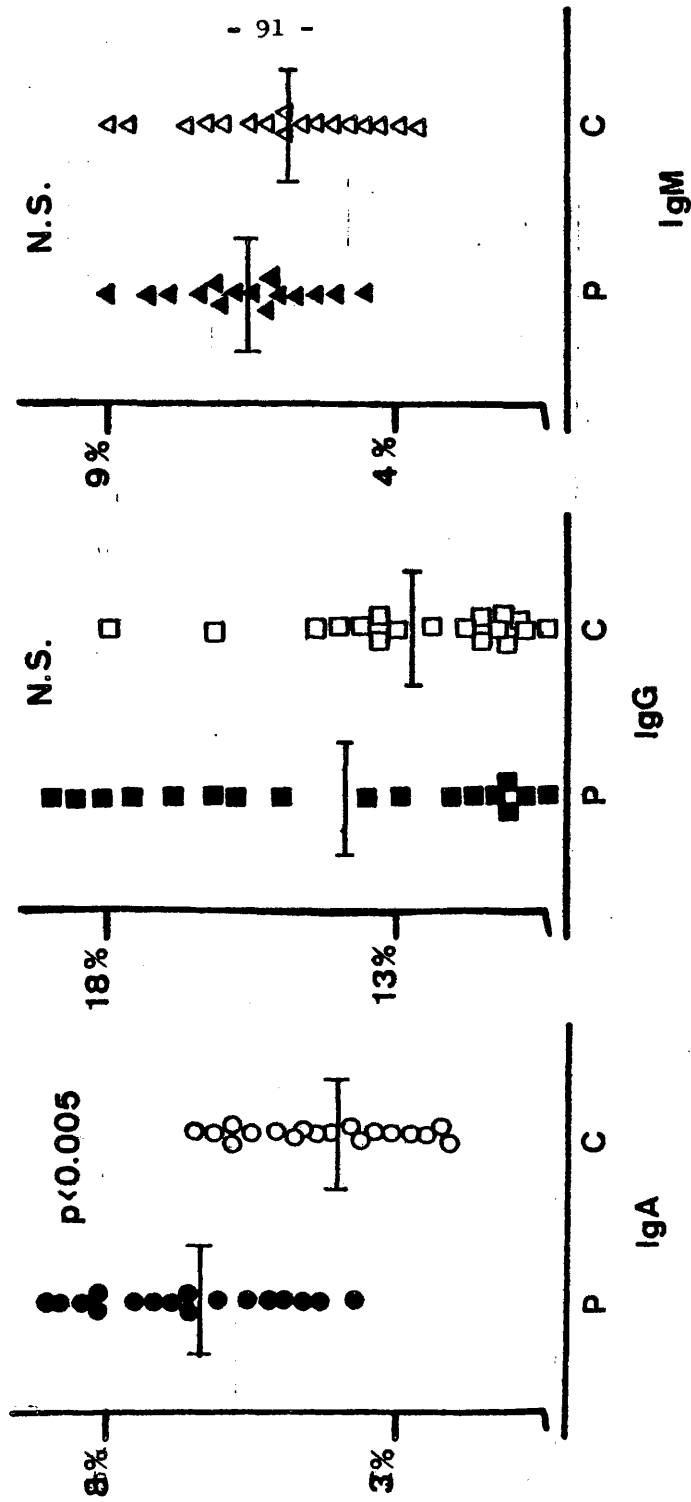


Fig.- 12

Estos resultados parecen apoyar el aumento en la proporción de IgA polimérica sintetizada, pero los bajos porcentajes de unión y la diferencia, aunque no significativa entre ambos grupos, inducen a pensar en un abordaje más específico y en la posibilidad de estar detectando poblaciones celulares que hayan fijado la inmunoglobulina de carácter polimérico sin ser directamente las responsables de su síntesis.

#### 4.1.C.2.- Receptores citoplasmáticos para el componente secretorio.

Receptores para el componente secretorio - se detectaron en el citoplasma de un 20% de los linfocitos estimulados con PWM. Un 40% de las células al final del cultivo tenían inmunoglobulinas intracelulares.

Cuando se detectó la clase de inmunoglobulina producida por las células que fijaban CS, se observó que la mayoría -- contenían IgM no existiendo diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles, en ninguno de los otros casos -- (Tabla 1). Ahora bien, el cálculo de la razón entre el número de células de un isotipo determinado que a su vez contenían CS y el número de células totales para esa misma inmunoglobulina, mostró un aumento significativo en la proporción de células sintetizadoras de IgA polimérica ( $69.21 \pm 13.16$ ) en los pacientes con nefropatía de IgA, con respecto al grupo control ( $44.27 \pm 11.27$ ). Este aumento era específico para las poblaciones IgA<sup>+</sup>, no apareciendo diferencias significativas en el caso de las IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>. (Fig.13)

#### 4.1.D.- Formación de cadena J y presencia en el citoplasma celular.

El aumento del número de células sintetizadoras de IgA con características poliméricas llevó a pensar en una posible alteración de los niveles intracitoplasmáticos de cadena J, - dada la necesidad de su presencia para la fijación del componente secretorio a la forma polimérica. Parece ser (20) que esta protei

TABLA Nº 1

PORCENTAJE DE CELULAS SINTETIZADORAS DE INMUNOGLOBULINAS, DESPUES DE  
7 DIAS DE CULTIVO EN PRESENCIA DE PWM (10 ml/ml)

	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
Pacientes (30)	6.44 ± 0.67	13.95 ± 1.11	30.01 ± 1.64
Controles (20)	7.70 ± 0.69	13.09 ± 1.15	36.10 ± 2.36
p	N.S.	N.S.	N.S.

Valores recogidos:  $\bar{x} \pm E.S$  (error estandar de la media)

p: Chi cuadrado.



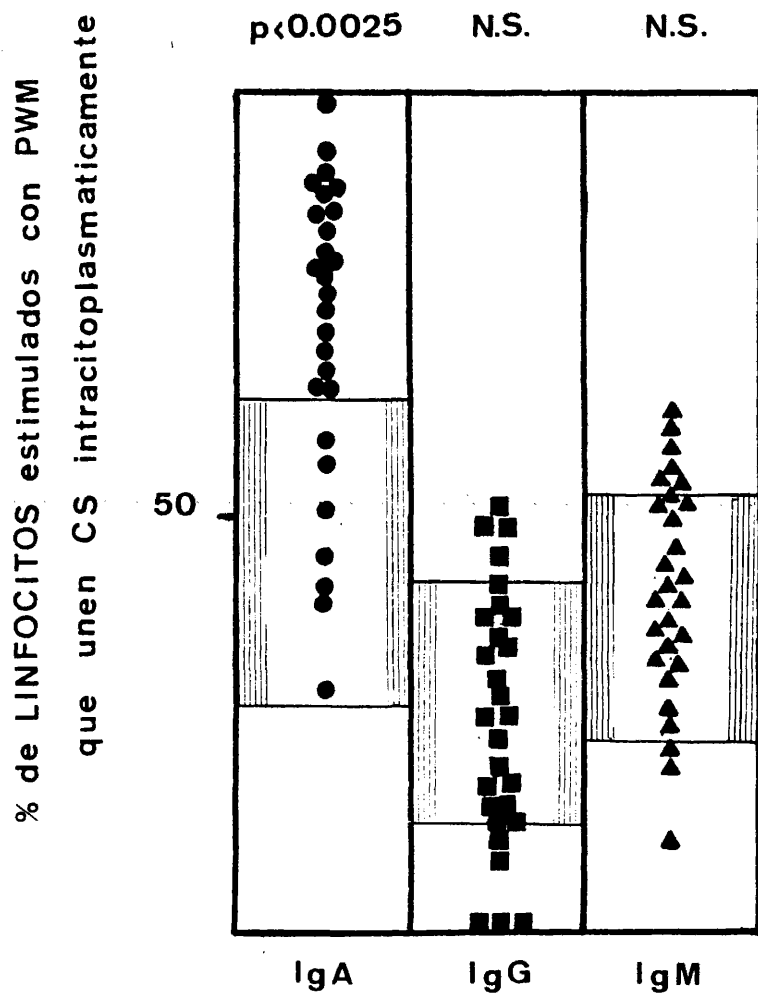


Fig.- 13

na desarrolló un importante papel en la polimerización de la molécula, dependiendo de su disponibilidad por parte de la célula implicada.

La presencia de cadena J se determinó utilizando un suero anti-cadena J humana preparado en cabra, que fue previamente adsorbido con un suero humano total precipitado con glutaraldehído según se explica en el apartado 1.2.A.10. El antisuero adsorbido no presentaba reacciones cruzadas con la IgA polimérica y monomérica, la IgM, ni con el suero humano total, conservando su especificidad frente a la cadena J.

Por inmunofluorescencia doble indirecta se detectó en un 6.30 % de las células mononucleares control no estimuladas - con PWM, la presencia de cadena J; mientras que en pacientes con nefropatía de IgA alcanzaba un  $15\% \pm 4.92$  (Fig. 14). La cantidad de células que contenían inmunoglobulinas en su citoplasma representaba un 4 % del total contado, siendo la distribución de IgA, IgG e IgM similar en ambos grupos. También fue similar el contenido de cadena J en cada una de estas poblaciones, oscilando entre un 75-80 % el porcentaje de variación. (Fig. 15 y 16 y 17).

La presencia de cadena J intracitoplasmática se incrementó sensiblemente tras la estimulación de los linfocitos con PWM (Fig. 14). Los porcentajes alcanzaron un  $30.9\% \pm 5.33$  en los pacientes y un  $23.28\% \pm 6.46$  en los controles, manteniendo las diferencias significativas ( $p < 0.025$ ) (Fig. 16). Las proporciones de linfocitos sintetizadores de IgA, IgG e IgM, también se incrementaron sensiblemente no presentando diferencias significativas con el grupo control (Tabla 1 y 2). Ahora bien, la proporción de células que contenían a su vez cadena J, dentro de cada grupo poblacional disminuyó sensiblemente en el caso de IgG e IgM, manteniéndose constante para la IgA, cosa que no ocurría en el grupo control (Fig. 16 y 17).

Estos resultados confirman los puestos de manifiesto mediante la fijación del componente secretorio en el citoplasma celular. Los porcentajes de células implicadas en la síntesis de IgA polimérica obtenidas por las dos técnicas fueron semejantes -

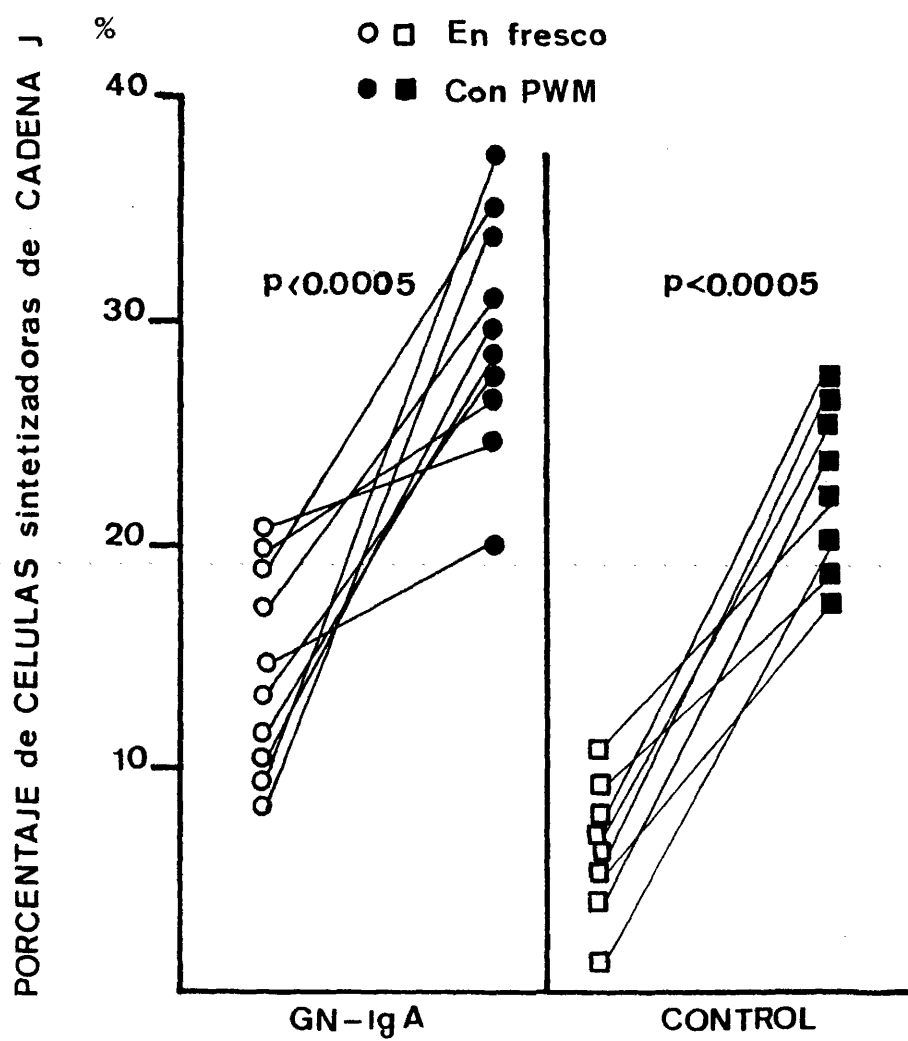


Fig.- 14

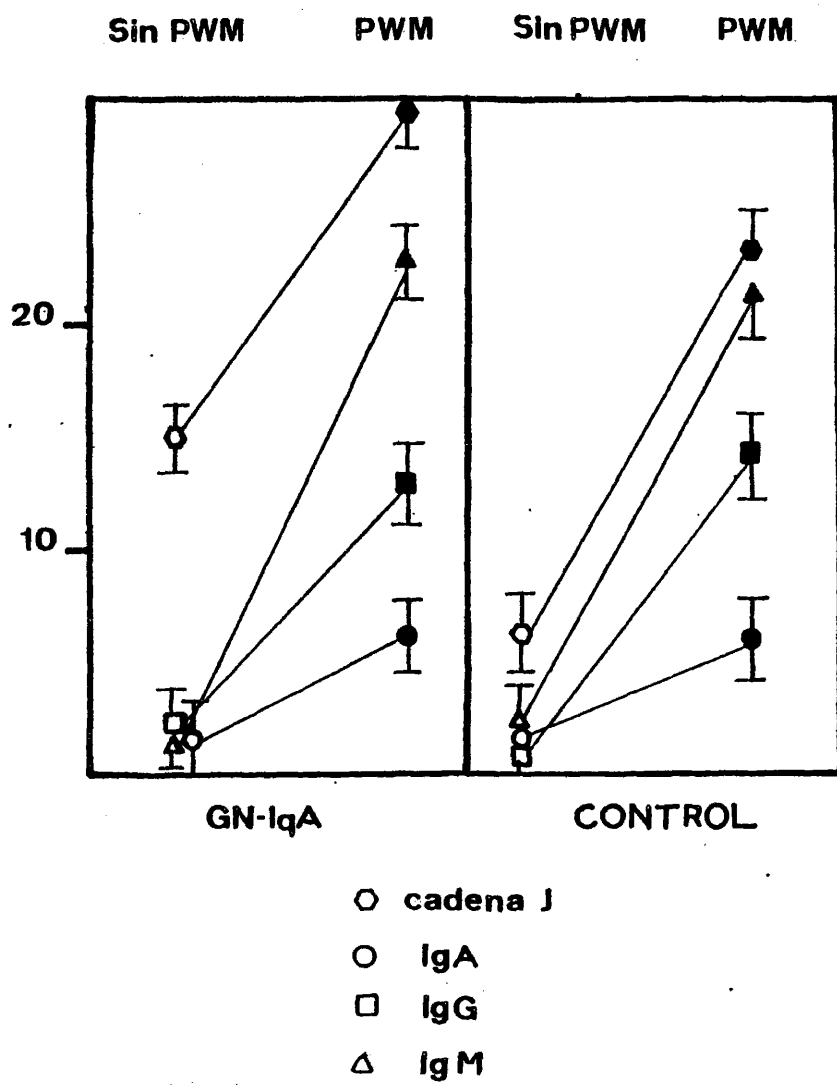


Fig.- 15

TABLA Nº2

PORCENTAJE DE CELULAS SINTETIZADORAS DE INMUNOGLOBULINAS EN PACIENTES  
CON NEFROPATIA DE IGA, ANTES Y DESPUES DE SU ESTIMULACION CON PWM.

	IgA	IgG	IgM
Frescas (10)	$1.52 \pm 0.44$	$0.93 \pm 0.53$	$1.43 \pm 0.53$
Con PWM (30)	$6.44 \pm 0.67$	$13.95 \pm 1.11$	$30.01 \pm 1.64$
p	0.0005	0.00025	0.00025

Valores recogidos:  $\bar{X} \pm E.S.$  (error estandar de la media)  
p = Chi cuadrado.

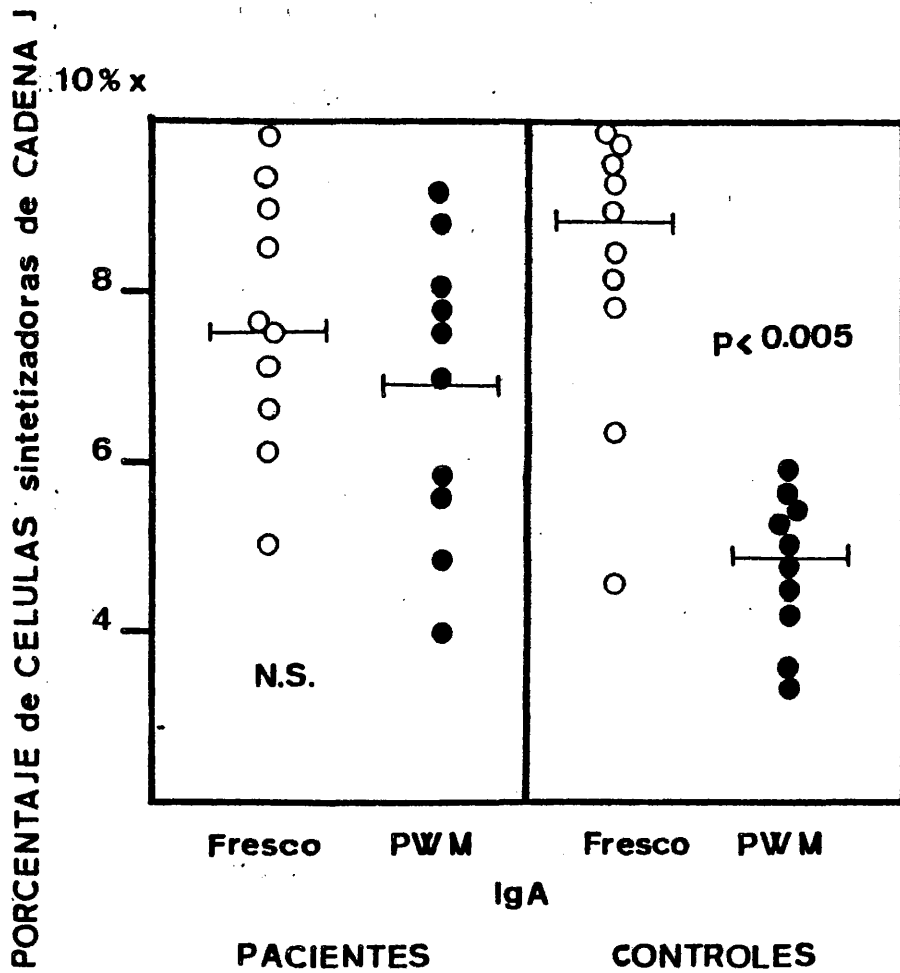
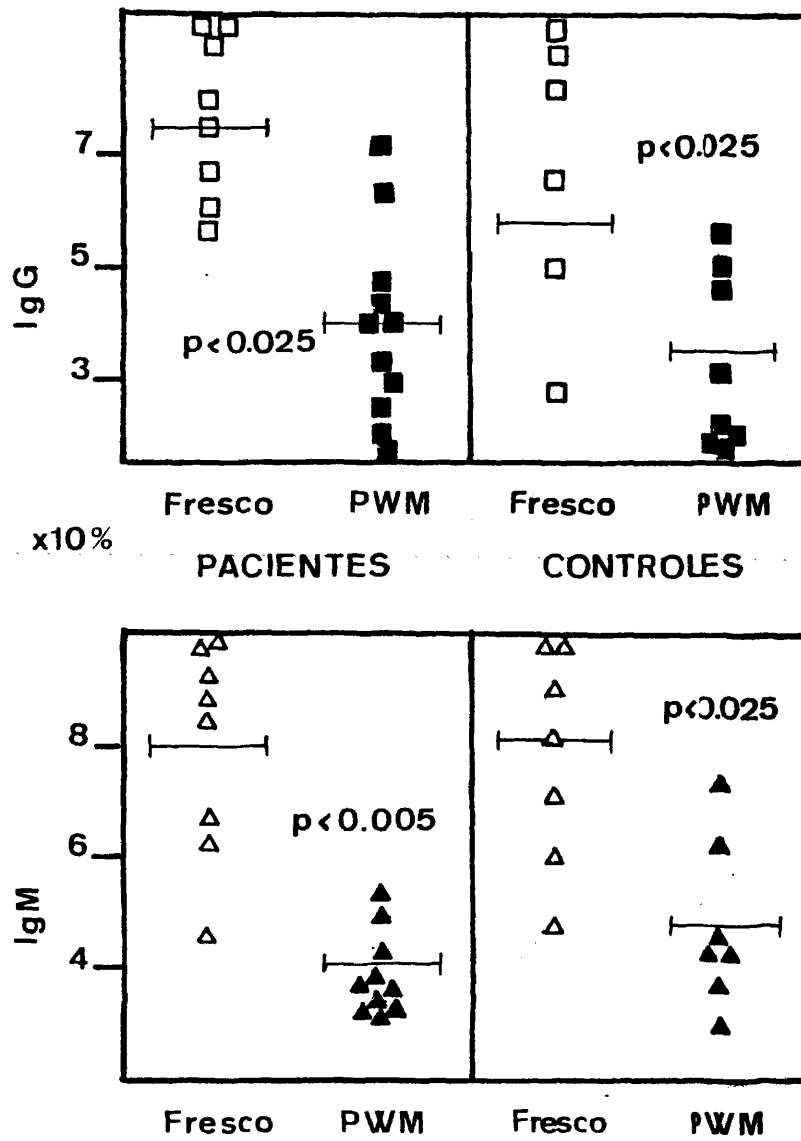


Fig.- 16

PORCENTAJE DE CELULAS SINTETIZADORAS DE CADENA J



68.45%  $\pm$  17.31 en el caso de la detección de cadena J y un 70.16%  $\pm$  20.46 para la fijación del componente secretorio.

La presencia de cadena J en el citoplasma celular - es un índice del grado de maduración de la célula (19). El aumento en sus niveles con relación al grupo control hablan en favor - de una cierta dificultad en la maduración de la población responsable de la producción de IgA en los pacientes con nefropatía de IgA.

4.1.E.- Bloqueo de la síntesis de inmunoglobulinas inducida por el PWM en presencia de un suero heterólogo anti-cadena J humana.

La adición de diluciones crecientes de un suero anti-cadena J humana obtenido en cabra, a un cultivo de linfocitos control de sangre periférica estimulados con PWM produce una modificación de la síntesis de IgA e IgM, en función de la dosis utilizada. La síntesis de IgG no se afecta por la presencia del - antisuero (Fig. 18, 19 y 20).

En individuos control, el suero ejerce una fuerte supresión de la síntesis de IgA, cuando las diluciones son bajas. - Disminuye paulatinamente hasta alcanzar un máximo a una dilución 1/480, que produce una estimulación en la producción de un 75% -- con respecto al basal. A partir de este punto, el efecto estimulador disminuye anulándose totalmente por encima de una dilución 1/2000. (Fig. 18).

En el caso de la IgM, el suero ejerce un efecto estimulador que alcanza su máximo entre las diluciones 1/60 y 1/120 - para anularse a partir de una dilución 1/480 (Fig. 19)

Cuando los linfocitos estimulados pertenecen a pacientes con nefropatía de IgA, el suero anti-cadena J, tampoco -- afecta la síntesis de IgG (Fig. 20). La producción de IgA sufre - una profunda modificación. Se produce una fuerte estimulación en la región de supresión para los controles (Fig. 18), disminuyendo, hasta alcanzar un máximo de supresión a una dilución 1/480, donde las células control sufren su máxima estimulación. A su vez, la -



Diluciones de suero Anti-cadena J Humana

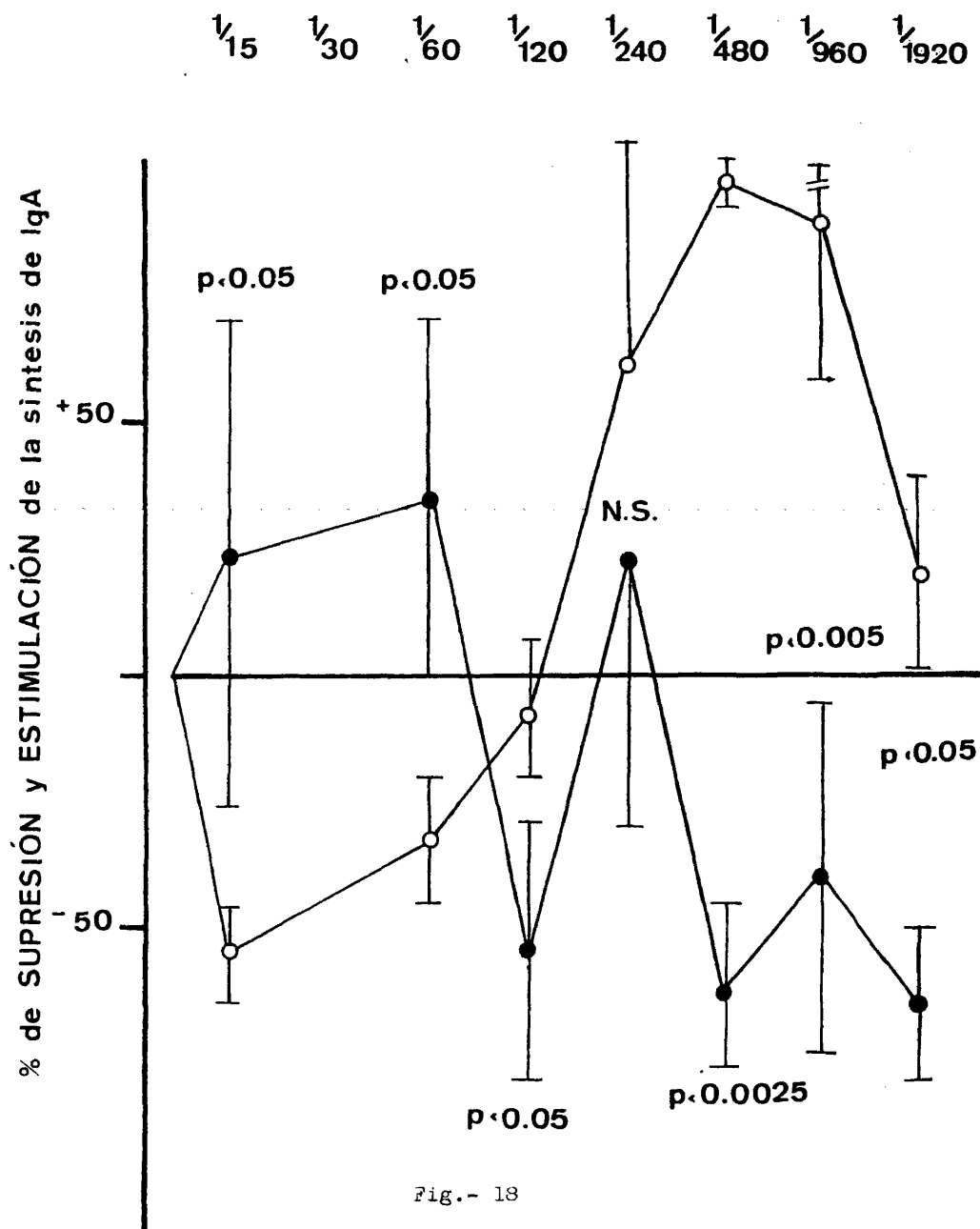
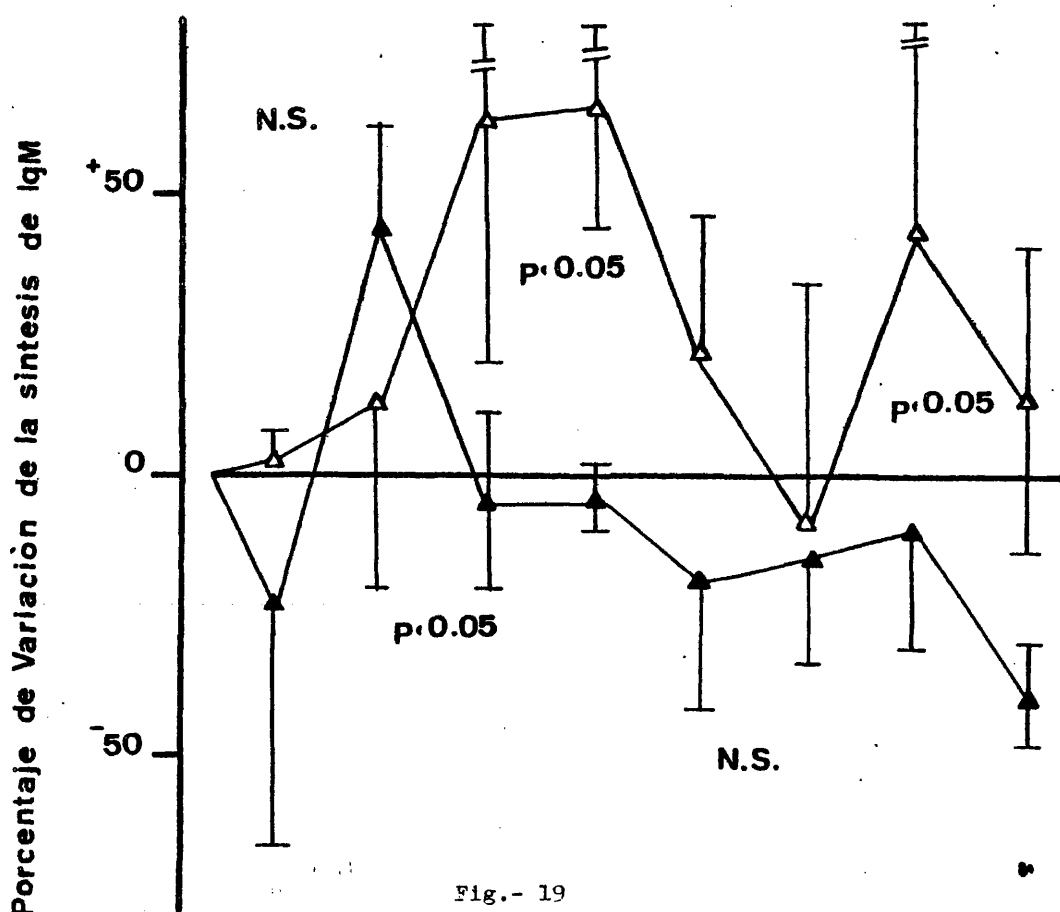


Fig.- 18

$\times \frac{1}{10}$  Diluciones de suero anti-cadena J Humana

$\frac{1}{15}$   $\frac{1}{3}$   $\frac{1}{6}$   $\frac{1}{12}$   $\frac{1}{24}$   $\frac{1}{48}$   $\frac{1}{96}$   $\frac{1}{192}$



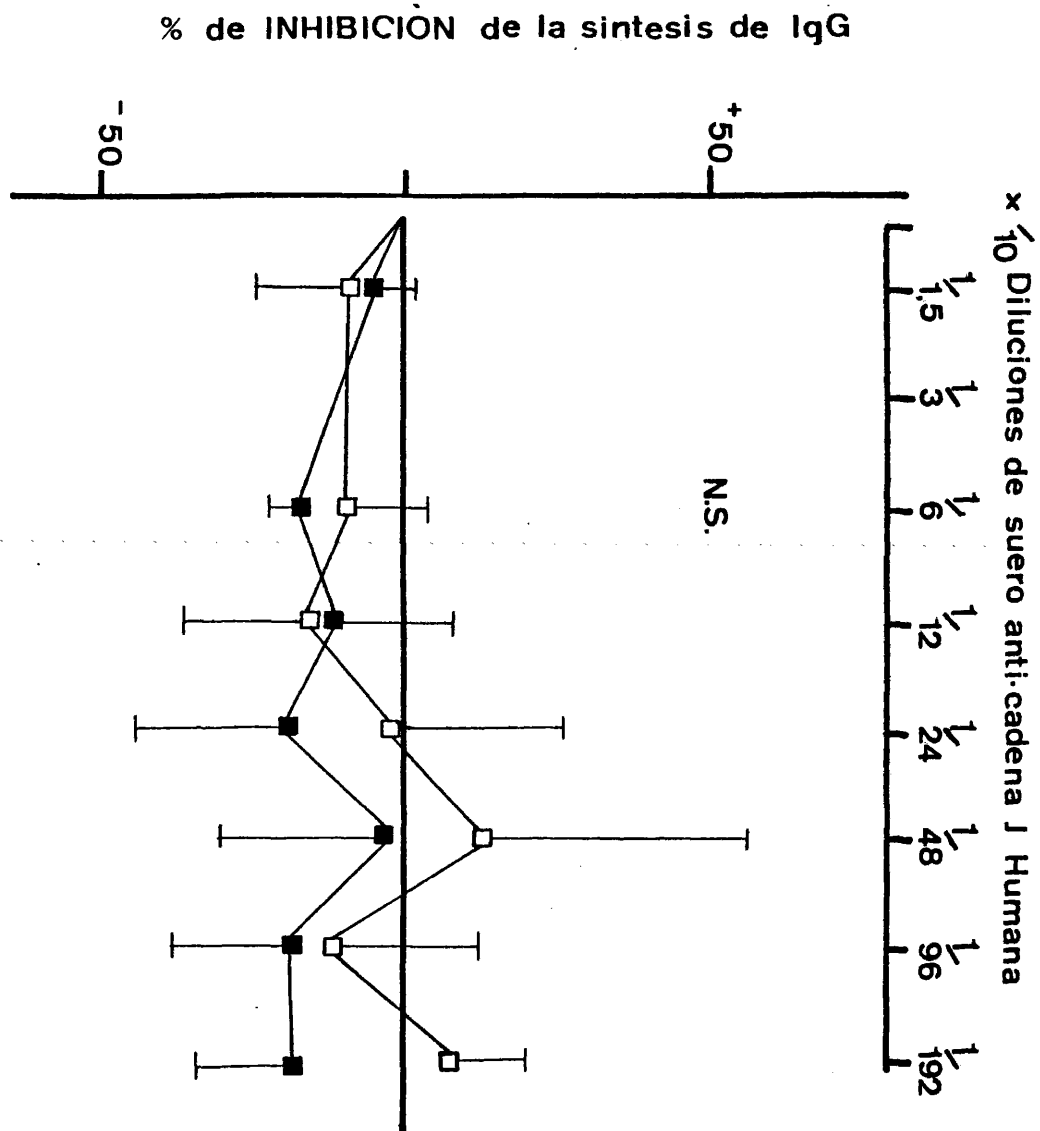


Fig.- 20

síntesis de IgM se ve ligeramente suprimida independientemente de la dosis utilizada, siendo significativas sus diferencias con respecto al control a 1/60 y 1/120, diluciones de suero anti-cadena-J humana.

En resumen, el suero anti-cadena J humana induce de forma diferente la síntesis de cada una de las inmunoglobulinas. Sólo las que presentan formas poliméricas: IgA e IgM, se ven afectadas por su presencia. La regulación en uno u otro caso es diferente.

#### 4.2.- Factores implicados en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas "in vitro".

##### 4.2.A.- Factores celulares

##### 4.2.A.1.- Generación de células supresoras inducidas por la Con A

En la figura 21 se han representado los porcentajes de variación de supresión de la síntesis de IgA en presencia de diferentes concentraciones de Con A.

La generación y expresión de células supresoras en función de la concentración estaba sensiblemente alterada en este caso. En los controles, bajas concentraciones de Con A: 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml y 5 µg/ml; no sólo no afectaban la síntesis de IgA, sino que aproximadamente el 50% de los casos estudiados, producían una estimulación de la misma, siendo el efecto neto análogo al producido al aumentar la proporción de células cooperadoras frente al de supresoras (43). A medida que aumentaba la concentración de Con A aparecía un efecto claramente supresor, alcanzando una meseta a los 50 µg/ml del mitógeno.

En los pacientes, la curva de generación de células supresoras y su acción sobre la síntesis aparecía invertida. Bajas concentraciones de Con A inducían una fuerte diferenciación de células supresoras que se manifestaba en una brusca supresión de la

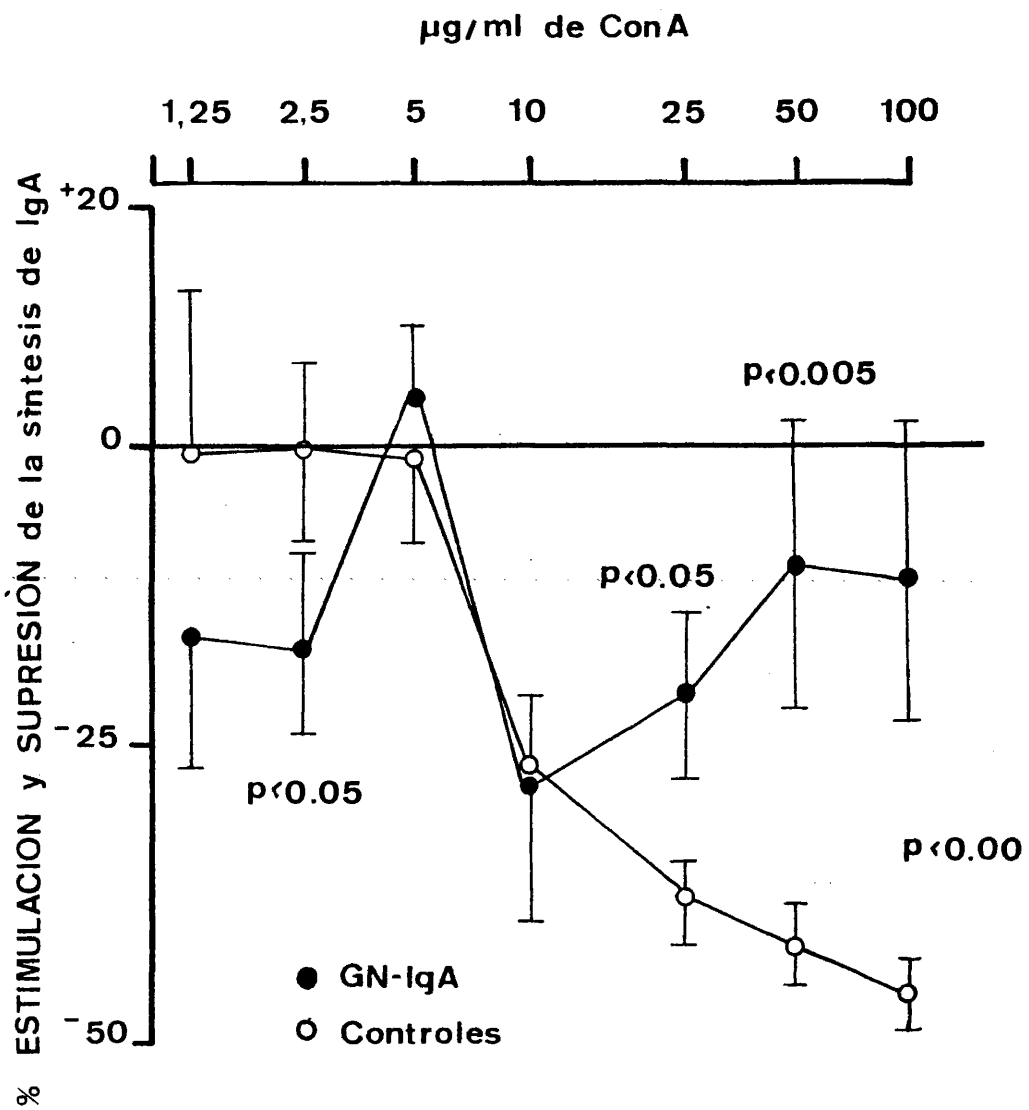


Fig.- 21

de SUPRESION y ESTIMULACION de la sintesis IgM

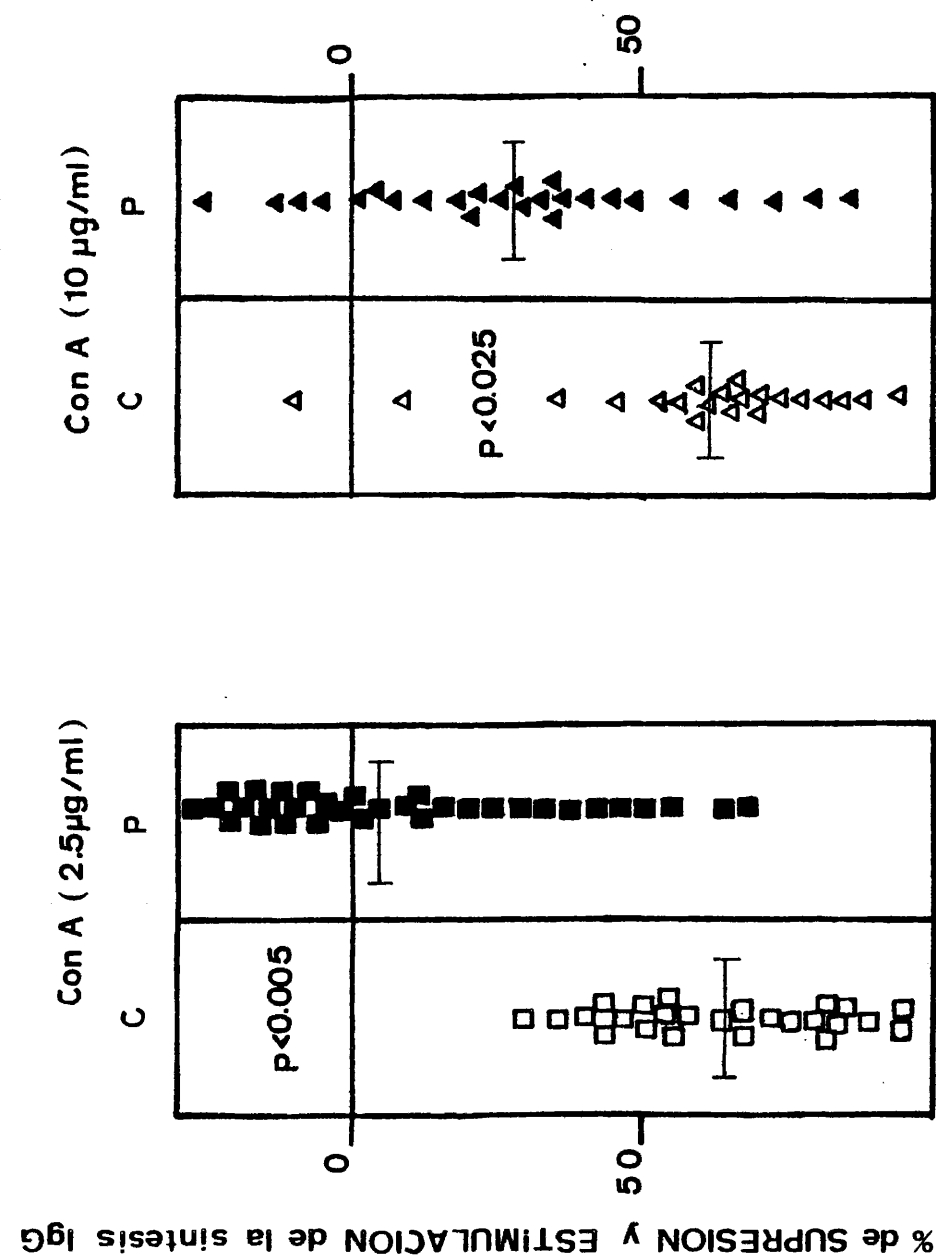


Fig.- 22

síntesis de IgA en el 60% de los casos estudiados. Estos datos = no se correlacionaban con los niveles producidos en presencia de PWM. Los porcentajes de supresión se mantuvieron e incluso disminuyeron a altas concentraciones de Con A, estando muy por encima= de los valores alcanzados en el caso de células control, indicando una clara incapacidad de las células T supresoras de los pacien-- tes con nefropatía de IgA para regular la síntesis normal de IgA.

La fuerte inhibición de la síntesis de IgA a bajas= concentraciones iba acompañada en aproximadamente el 50% de los casos de una falta de supresión de la síntesis de IgG y un comportamiento normal en la regulación de la síntesis de IgM. (Fig. 22)

Es curioso destacar que sólo aparece afectada la regulación de la síntesis de IgM a 10 µg/ml de Con A, concentración a la cual la IgA e IgG, presentan una regulación normal.

#### 4.2.A.2.- Cultivo mixto de linfocitos

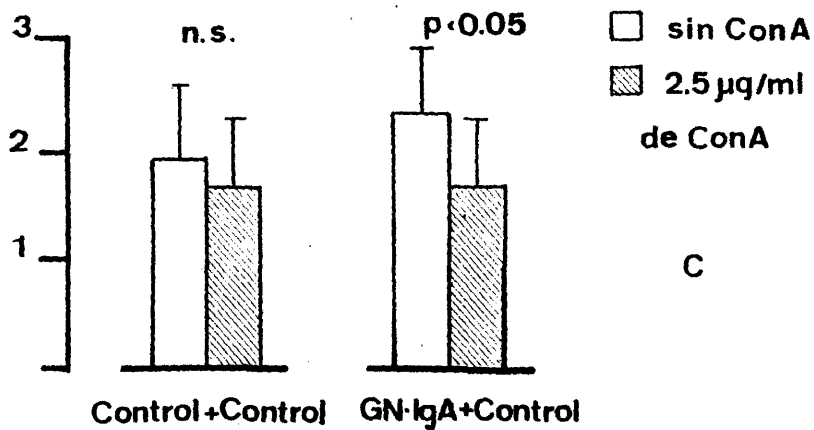
Para determinar si el trastorno en la regulación observada en pacientes con nefropatía de IgA era debida= a un trastorno en la generación y expresión de células "supreso-- ras" ó bien a una incapacidad de la célula blanco para ser suprimida, se ensayó la capacidad de supresión de de estas células inducidas por un tratamiento previo a 2,5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml = de Con A durante 48 horas sobre un cultivo de linfocitos normales

Los resultados obtenidos sobre la síntesis mediante esta técnica fueron análogos a los proporcionados por el método = de Miller (140) (ver apartado anterior). Los niveles de producción fueron algo más elevados debidos a la estimulación alogénica, pero en ningún caso significativos con relación a los obtenidos en= experiencias anteriores. Los porcentajes de supresión fueron más= altos en cultivos mixtos control, siendo a su vez más acusadas las diferencias en el comportamiento regulador de pacientes y controles, sobre el mismo grupo control alogénico. (Fig. 23C)

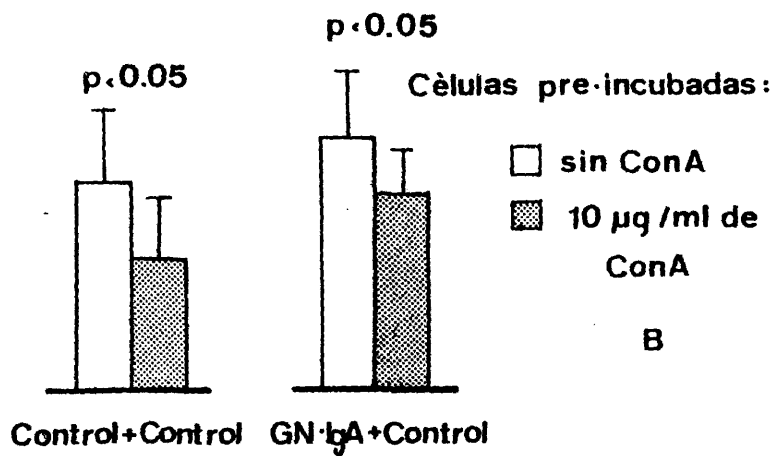
A una concentración de 10 µg/ml (Fig. 23B), el comportamiento de las células de pacientes y controles fue similar,= produciendo una reducción de un 48.28%  $\pm$  18.38 los controles y=

- 199 -

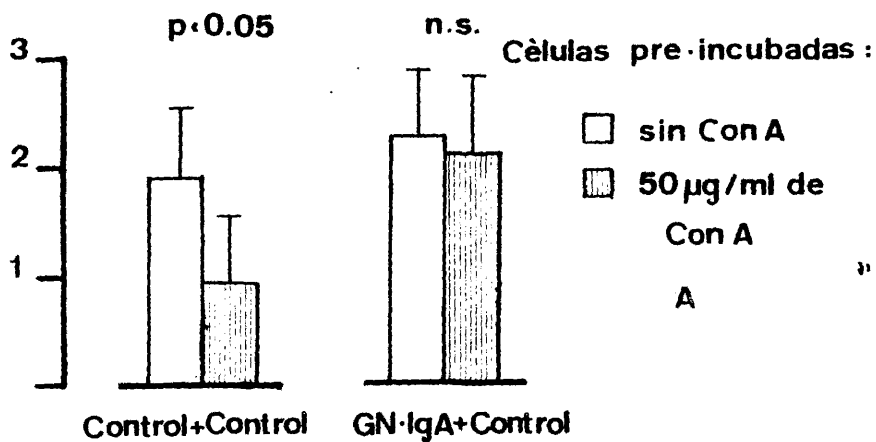
Células pre-incubadas:



C



B



A

Fig.- 23



TABLA Nº 3

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE SUPRESION DE LA SINTESIS DE IgG EN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS CONTROL INCUBADOS CON CELULAS CONTROL (Cs) Y DE PACIENTES (Ps) PRETRATADAS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE Con A, DURANTE 48 h Y EN PRESENCIA DE 10 µg/ml DE PWM

	50 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Cs + C	50.48 ± 10.87	23.24 ± 1.63	11.29 ± 3.00
Ps + C	52.30 ± 8.20	15.63 ± 8.06	1.97 ± 5.71
p	N.S.	N.S.	0.05

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.S.$  ( error estandar de la media)

p: Chi cuadrado

TABLA Nº 4

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE SUPRESION DE LA SINTESIS DE IgM EN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS CONTROL (C) CON CELULAS PREINCUBADAS 48 horas CON - CONCENTRACIONES VARIABLES DE Con A, DE CONTROLES ALOGENICOS (Cs) Y PACIENTES (Ps) CON NEFROPATIA DE IGA EN PRESENCIA DE 10  $\mu$ g/ml DE PWM.

	<u>50 <math>\mu</math>g/ml</u>	<u>10 <math>\mu</math>g/ml</u>	<u>2.5 <math>\mu</math>g/ml</u>
Cs + C	56.46 $\pm$ 3.52	64.19 $\pm$ 9.36	31.58 $\pm$ 10.17
Ps + C	51.49 $\pm$ 6.24	20.59 $\pm$ 19.90	32.99 $\pm$ 8.49
p	N.S.	0.05	N.S.

Valores medios recogidos:  $\bar{X} \pm E.S.$  (error estandar de la media)

p : Chi cuadrado



de un  $36.34\% \pm 13.34$ , los pacientes. En el caso de la IgG e IgM - tampoco aparecieron diferencias apreciables (Tabla 3 y 4).

Por último, las células mononucleares de los pacientes pretratadas a una concentración de  $2,5 \mu\text{g/ml}$  de Con A redujeron en un  $37.81\% \pm 15.97$  la síntesis de IgA, efecto que no se manifestó en las células control tratadas en iguales condiciones. Un comportamiento inverso se reveló para la síntesis de IgG (Tabla 3), donde los pacientes sólo redujeron en un  $5.60\% \pm 22.82$  la producción, mientras que alcanzaba un  $23.24\% \pm 4.94$  (p 0.025) en el grupo control.

Estos resultados confirman el comportamiento cinético observado para la actividad de las células supresoras. La rápida diferenciación y supresión a bajas concentraciones y el mantenimiento de estos niveles a altas dosis, hablan en favor de una cierta alteración dosis-dependiente de la generación de supresores específicos de IgA, más que de una incapacidad de la población -- responsable, para el ejercicio de la función supresora propia. El efecto neto de esta alteración favorecería el aumento de la síntesis de IgA observada en cultivo, tras su estimulación policlonal con PWM.

#### 4.3.A.3.- Análisis de poblaciones de células T reguladoras, mediante el uso de anticuerpos monoclonales

A la vista de los resultados obtenidos en la generación y expresión de células supresoras, se planteó el análisis de los niveles de células implicadas en la regulación presentes en los pacientes previo a su mantenimiento en cultivo y -- tras su estimulación con PWM, donde se expresa el aumento específico en la síntesis de IgA.

En la fig.- 24 se han recogido los porcentajes de linfocitos con características de células T-OKT  $3^+$ , de células T-supresoras OKT- $8^+$ , linfocitos T cooperadores OKT- $4^+$  y el índice OKT- $4^+$ /OKT- $8^+$  en una población de células frescas extraídas de sangre periférica.

Los porcentajes de células OKT- $3^+$ , OKT- $4^+$ , OKT- $8^+$  -

encontradas en la población control fueron similares a los indicados como óptimos, según la especificidad de cada uno de los anticuerpos, aunque ligeramente menores que los encontrados por otros grupos. No hubo diferencias en los porcentajes de células OKT-3<sup>+</sup> entre pacientes y controles. Ahora bien, el balance entre células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> estaba elevado en la nefropatía de IgA con un porcentaje significativamente aumentado de células OKT-4<sup>+</sup> de características cooperadoras (20 de 27 pacientes) y un porcentaje normal de células supresoras OKT-8<sup>+</sup>. Siete de estos pacientes presentaban simultáneamente un incremento en los porcentajes de células OKT-4<sup>+</sup> OKT-8<sup>+</sup>, con un ratio normal OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup>. Un grupo de cuatro pacientes y tres controles examinados en dos ocasiones diferentes mostraron niveles semejantes a los ya detectados y una persistencia en los porcentajes elevados de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>.

La suma entre los porcentajes de células OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> fue significativamente mayor que el número de células OKT-3<sup>+</sup> detectadas. Esto nos llevó a pensar en la expresión simultánea de ambos marcadores sobre la superficie de algunas poblaciones de células T. La adición simultánea de ambos anticuerpos OKT-8 y OKT-4 a una misma población celular no reveló diferencias apreciables entre controles y pacientes. Así como, el porcentaje de células con ambos marcadores (diferencia entre %OK(T4<sup>+</sup>+T8<sup>+</sup>) y % OKT(4-8)<sup>+</sup>) tampoco fue significativamente mayor. Estos resultados no pueden descartar la posibilidad de que el menor porcentaje de células OKT-3<sup>+</sup> sea consecuencia de un fallo en la especificidad de este anticuerpo monoclonal. (Tabla N°5). Ahora bien, aunque las diferencias no sean significativas, no puede pasarse por alto el hecho de que 4 de los 8 pacientes, en los que se caracterizó el número de células que expresan ambos marcadores, tengan unos porcentajes de este tipo poblacional entre un 7-10%, cuando el límite superior en los controles es de un 6%.

Los porcentajes de células T totales, T cooperadoras y T supresoras tras 7 días de cultivo en ausencia de PWM no se modificaron en relación a los obtenidos en fresco. Persistía el incremento en el porcentaje de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup> y el au-

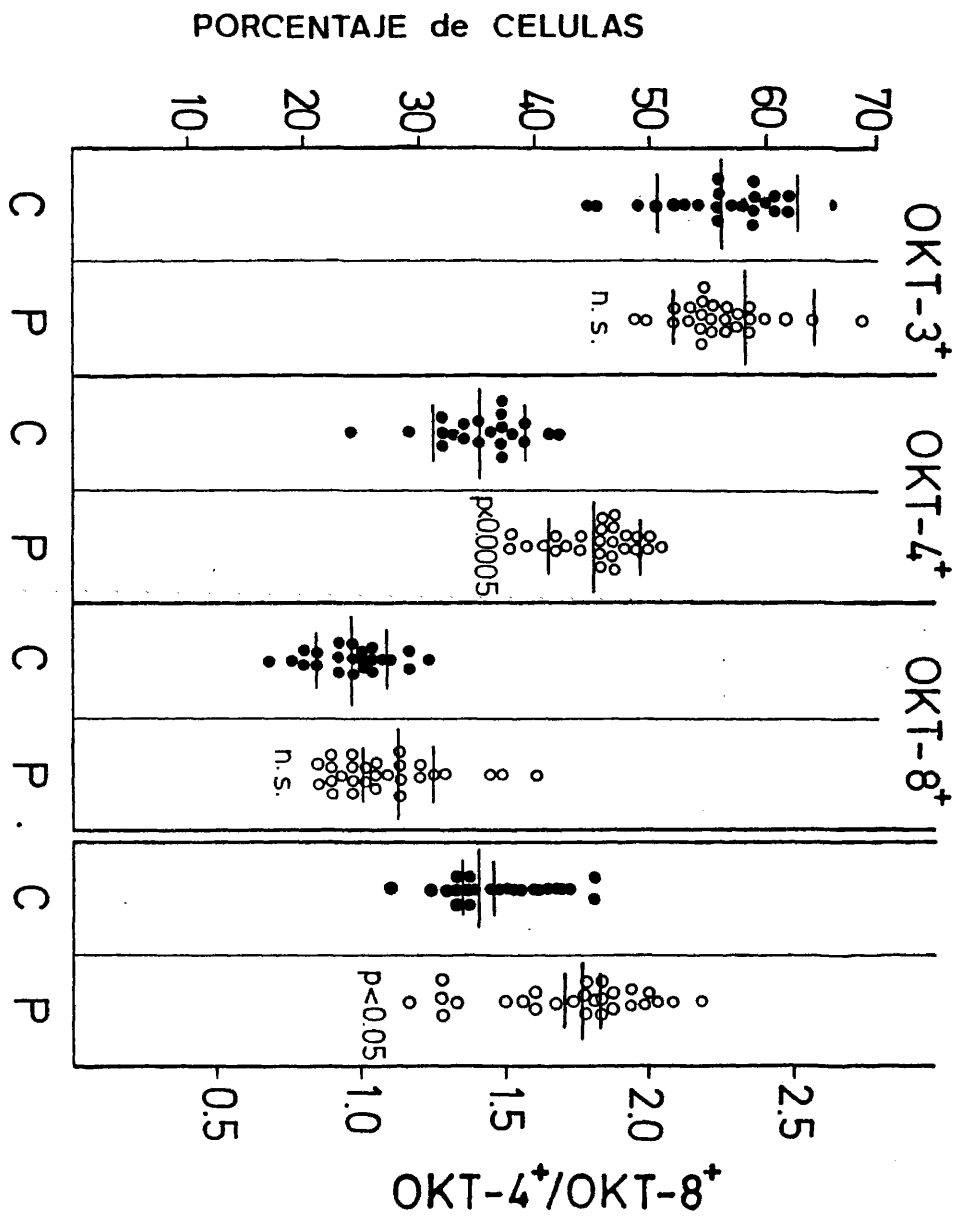


Fig. - 24

TABLA Nº 5

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE CELULAS REGULADORAS TOTALES EN PACIENTES CON NEFROPATIA DE IGA Y CONTROLES

	<u>Cel.OKT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OK(T4<sup>+</sup>+T8<sup>+</sup>)</u>	<u>Cel.OKT(4-8)<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OK(t4<sup>+</sup>+t8<sup>+</sup>)-OKT-(4-8)<sup>+</sup></u>
Controles (7)	56.36 ± 1.42	63.65 ± 1.27	67.80 ± 0.96	3.30 ± 0.90
Pacientes (8)	57.77 ± 1.44	71.69 ± 1.67	63.48 ± 2.57	5.58 ± 0.42
p <	N.S.	0.005	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.E.$  (error estandar de la media)  
p: Chi cuadrado.

TABLA Nº 6

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS T GENERADAS EN CULTIVO DE CELULAS CONTROL

	<u>Cel.OKT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-4<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-8<sup>+</sup></u>	<u>OKT-4/OKT-8<sup>+</sup></u>
Frescas (23)	56.36 ± 1.42	35.47 ± 0.19	24.16 ± 0.72	1.47 ± 0.05
Sin PWN <sup>x</sup> (cul)	59.04 ± 2.56	34.35 ± 1.85	22.39 ± 3.21	1.57 ± 0.26
PWM (cul.) <sup>xx</sup>	58.33 ± 0.49	36.27 ± 1.70	23.15 ± 1.65	1.58 ± 0.13
p <sup>x</sup> <	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
p <sup>xx</sup> <	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.E.$  ( error estandar de la media)

p: Chi cuadrado.

115

TABLA Nº 7

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON NEFROPATIA DE IGA, GENERADOS EN CULTIVO

	<u>Cel.OkT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OkT-4<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OkT-8<sup>+</sup></u>	<u>OkT-4<sup>+</sup>/OkT-8<sup>+</sup></u>
Frescas (27)	57.77 ± 1.44	45.35 ± 0.42	26.34 ± 1.18	1.76 ± 0.06
Sin PWM <sup>x</sup> (cul)	58.16 ± 1.96	46.20 ± 0.92	27.57 ± 1.17	1.69 ± 0.06
PWM (cul.) <sup>xx</sup>	58.89 ± 2.06	45.79 ± 0.97	26.91 ± 1.42	1.71 ± 0.09
$p^x$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
$p^{xx}$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.E.$  (error estandar de la media)  
p : Chi cuadrado



mento en la relación OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> observado en la nefropatía de IgA (Tablas 6 y 7). Idénticos resultados aparecieron tras estimular con PWM, no pudiendo correlacionar ninguno de los porcentajes con los niveles de IgA producidos en esas condiciones

Para observar los cambios en las subclases de células T en la generación de células supresoras inducidas por la Con A, los pacientes y controles fueron fenotipados con anticuerpos monoclonales en presencia y ausencia del estímulo inductor.

En la figura 25 aparece recogido el marcado incremento en el porcentaje de células OKT-8<sup>+</sup> al final de un cultivo control tratado con 50 µg/ml de Con A, mientras que no hay a penas aumento en el porcentaje de células supresoras en el caso de los pacientes. Analizados los porcentajes tras incubación PWM y 2.5 µg/ml de Con A, los controles experimentaron una reducción en el porcentaje de células supresoras en relación a sus niveles basales cuando sólo se había incubado con PWM. Los pacientes no sólo no tenían la reducción, sino que se producía un ligero aumento en este punto.

Las diferencias de comportamiento en la generación de células supresoras en función de la Con A se aprecian mejor en la figura 26A. La presencia de la lectina no influye en la diferenciación de supresores, al contrario de lo que ocurre en los controles, siendo su proporción constante en el medio con independencia de la dosis mitogénica utilizada.

Paralelamente, la generación de cooperadoras corrió pareja con la de supresoras, confirmando las hipótesis que sostenían que el efecto cooperador ó supresor observado en un cultivo dependía de las proporciones de células cooperadoras ó supresoras presentes en el mismo. En los pacientes con nefropatía de IgA (Fig. 26A), la presencia de Con A inducía una disminución significativa en el número de células T cooperadoras, con relación a su situación basal, siendo su proporción en el cultivo también independiente de la dosis mitogénica utilizada. Este comportamiento se traducía en una fuerte alteración de las proporciones de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> con relación a la situación presentada por controles

x10 Porcentaje de células OKT-8+ estimulados con PWM

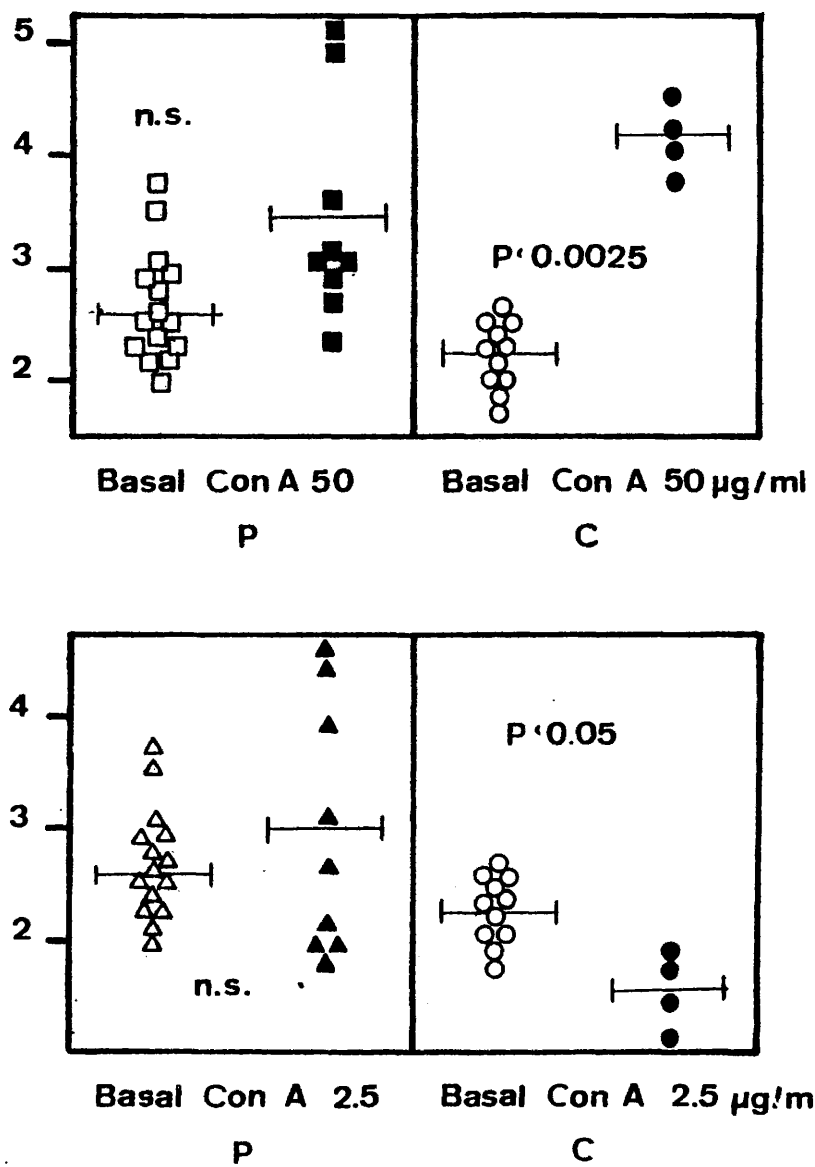


Fig.- 25

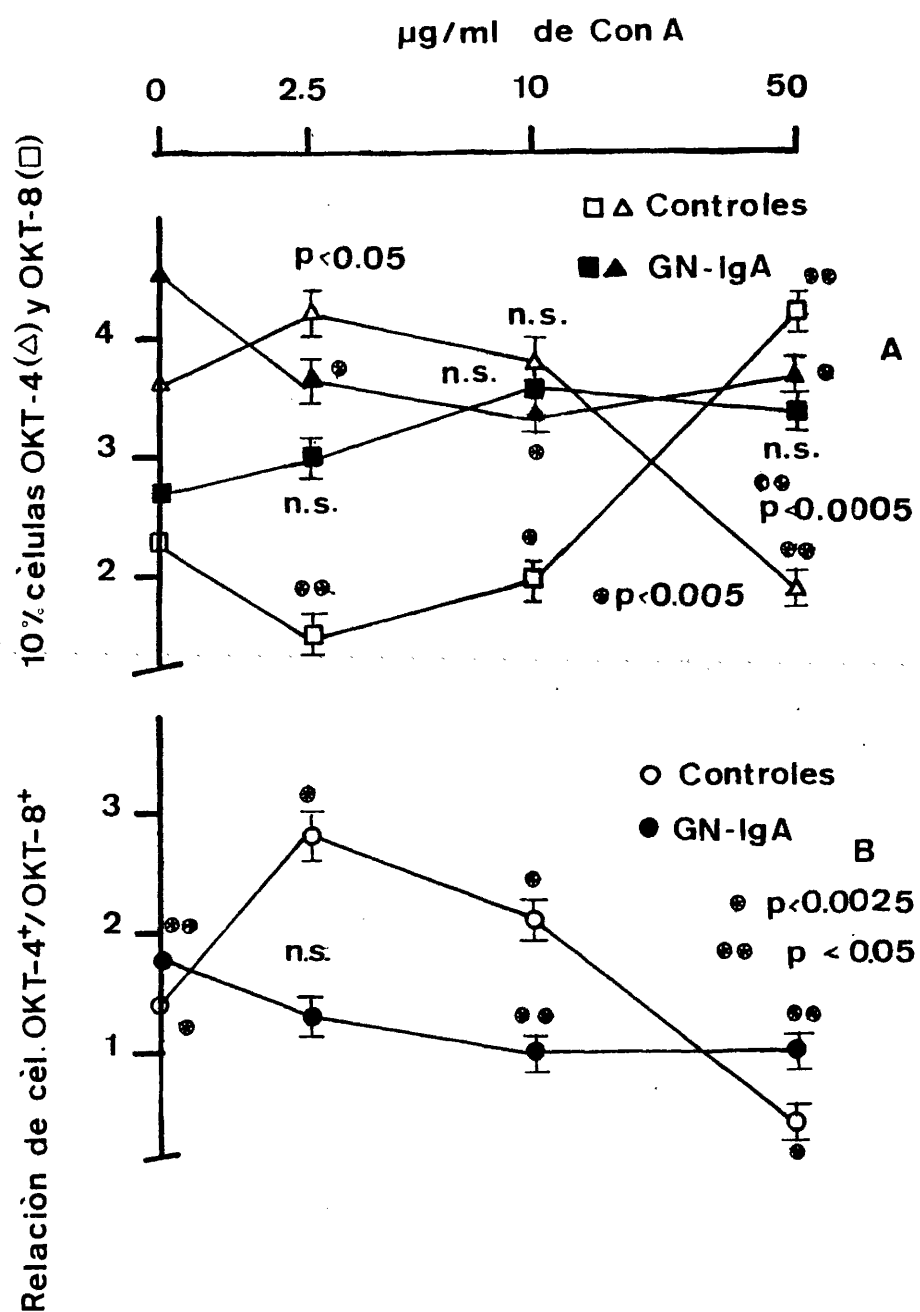


Fig. - 26

(Fig. 26B).

Estos resultados estan de acuerdo con los cambios -- apreciados en la actividad supresora de las células T inducidas -- por la Con A sobre la síntesis de inmunoglobulinas en los pacientes con esta nefropatía. Ahora bien, es curioso destacar que no -- es posible establecer una correlación entre ninguno de los porcentajes, ya sean de células OKT-4<sup>+</sup> u OKT-8<sup>+</sup>, y la actividad supresora inducida por la Con A. La explicación de esta cuestión es difícil. Es posible que los OKTs esten poniendo de manifiesto una reagrupación grosera y ya generalizada del sistema regulador dentro del -- cual, se englobaría el fallo del fino mecanismo propio de la IgA -- y que permitiría mantener dentro de unos márgenes de respuesta -- aceptables el funcionamiento integrado del sistema inmune.

#### 4.2.A.4.- Estudio de la actividad de células T cooperadoras de la síntesis de IgA

El alto porcentaje de células T cooperadoras, la falta de actividad supresora y la dificultad en la generación normal de células supresoras, llevó a pensar que el aumento en la síntesis de IgA podría ser debido más que a un fallo de la supresión a un aumento en la capacidad cooperadora de los linfocitos T en estos pacientes.

Para analizar esta capacidad, se realizó una separación de linfocitos en poblaciones enriquecidas en células T y B, -- a partir de células mononucleares de sangre periférica, co-cultivándose con proporciones iguales de estas poblaciones respectivamente aisladas de individuos control.

El co-cultivo de células T y B de controles alogénicos proporcionó una síntesis mayor de IgA que la hallada para cultivos de células totales, manteniéndose dentro de los rangos normales de producción. Un resultado similar se obtuvo para los pacientes con nefropatía de IgA.

En la figura 27A aparecen recogidos los resultados -- obtenidos al co-cultivar las células B de una población control -- con las células T de los pacientes, observándose un aumento sig-

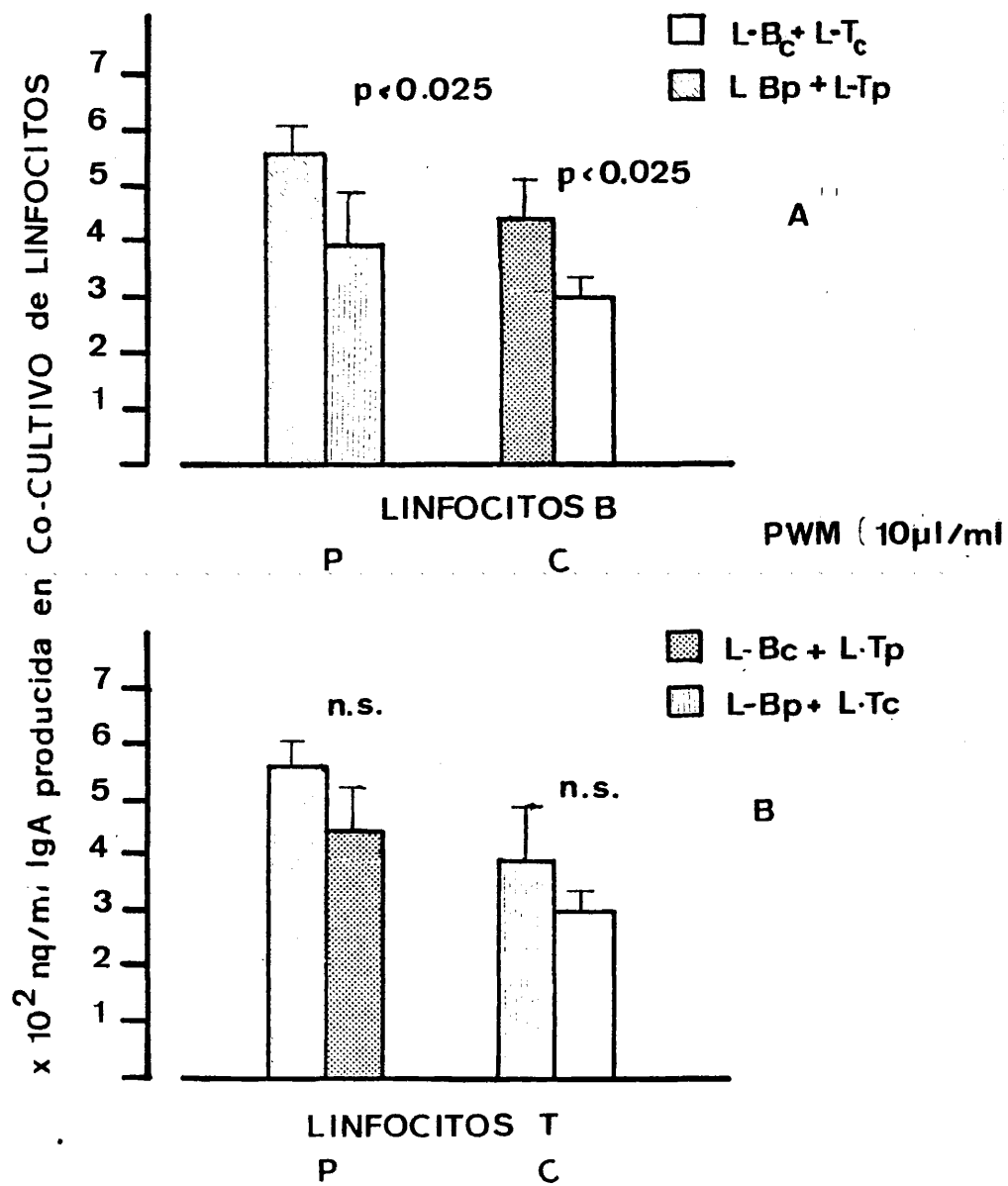


Fig.- 27

nificativo de la síntesis de IgA ( $406 \pm 140$  frente a  $303 \pm 61$ ) en relación a la situación obtenida cuando las células T provenían de controles alogénicos ( $p < 0.025$ ). El comportamiento de las células B de los pacientes se normalizó al ser tratadas con células T de controles, alcanzando una producción casi normal en estas condiciones.

El aumento en la actividad cooperadora de las células T se observó en el 60% de los pacientes estudiados (7/12). A pesar de la reducción en la síntesis de IgA tras el tratamiento -- con células T controles, las células B del 40% de los pacientes= (5/12) no fueron susceptibles de una regulación normal por células T controles, compartiendo 3 de estos individuos un aumento de la actividad cooperadora T, sobre células normales B (Fig. 27B).

Estos resultados permiten deducir que el aumento de la síntesis de IgA es consecuencia en parte de la hiperactividad de las células cooperadoras, con una pérdida secundaria de la actividad supresora para esa población. Pero el hecho de que las células B de un 40% de pacientes no sean regulables y parte de ellos compartan ambos defectos, junto con la falta de correlación entre estos datos y los aportados por la clínica, apuntan una evolución continuada del estado inmunológico de estos pacientes, no pudiendo descartar la posible participación de las células B, como un suceso temprano en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad.

#### 4.2.B.- Factores séricos

Los resultados comentados hasta el momento, la dificultad a la hora de interpretar algunos hechos implicados en la regulación de la síntesis de IgA y la permanencia de elevados niveles en suero de IgA polimérica parcialmente en forma de inmuno-complejos, condujo a pensar en una posible participación de la propia IgA sérica en los mecanismos de control y regulación de la síntesis de inmunoglobulinas. Para estudiar este aspecto del problema se realizaron un conjunto de experiencias cuyos resultados - aparecer a continuación

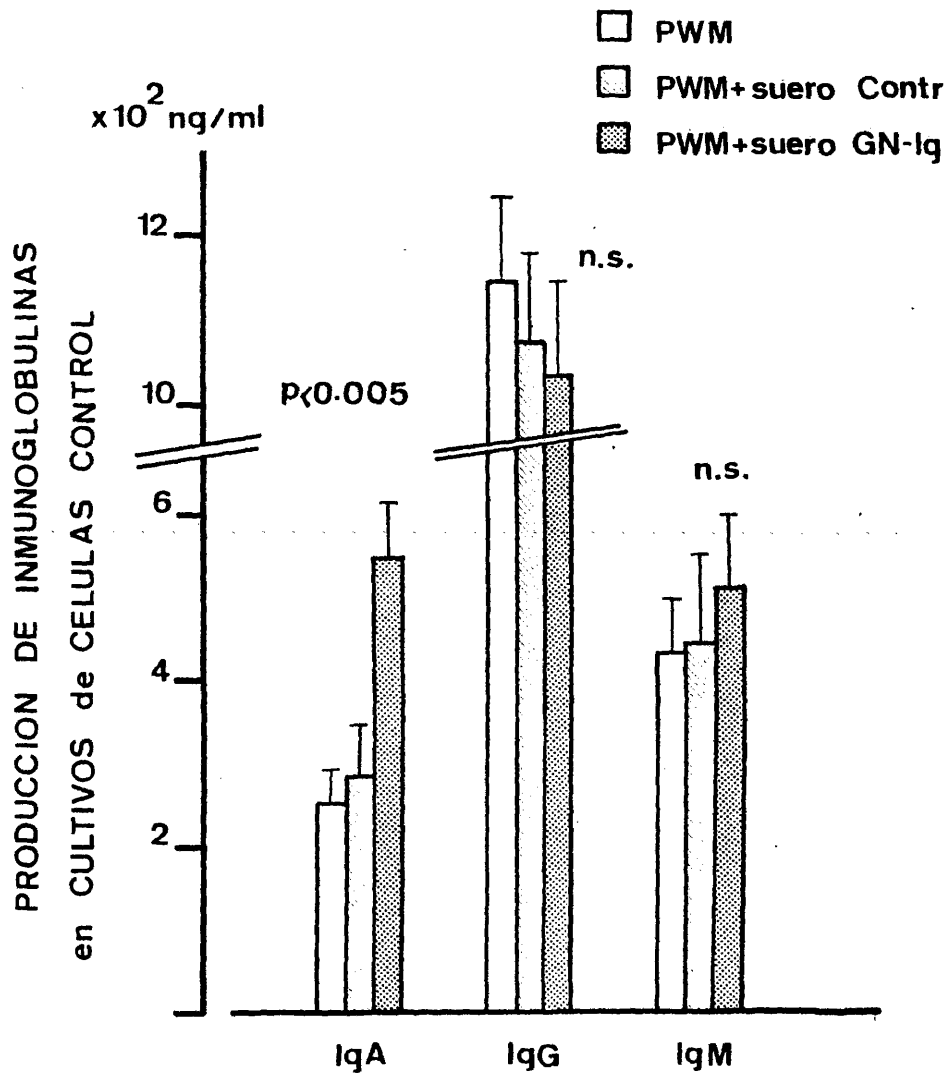


Fig.- 28

4.2.B.1.- Efectos del suero de pacientes con nefropatía de IgA, sobre la síntesis de inmunoglobulinas en individuos - control

Las células mononucleares de sangre periférica se incubaron durante 2 horas con sueros de pacientes con nefropatía de IgA, cuantificados y diluidos al 1/10, cultivándose en presencia de PWM, previa eliminación del suero, 7 días en las condiciones habituales de cultivo.

La síntesis de inmunoglobulinas se elevó de forma no significativa al incubar las células control con sueros de otros individuos control, en relación a la producción cuando la incubación se realizaba con suero propio. Curiosamente la síntesis de IgA aumentaba al incubar con sueros de pacientes de forma significativa ( $p < 0.0025$ ), alcanzando una producción similar a la encontrada en los pacientes con esta enfermedad. Este efecto no se observó para la síntesis de IgG, mientras que la de IgM se incrementó sensiblemente, permaneciendo en el límite de significación (Fig. 28).

4.2.B.2.- Niveles de células T reguladoras de la síntesis de inmunoglobulinas en cultivos control pretratados con suero de pacientes con nefropatía de IgA

El análisis de las poblaciones de células reguladoras mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, antes y después de su incubación con el suero, puso de manifiesto un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la población de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>, en relación a la misma situación previa incubación con sueros controles (Tabla Nº8). Curiosamente el incremento en la relación OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> no fue significativo a pesar de mantenerse los niveles de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> dentro del rango normal. No hubo diferencias entre los porcentajes de células OKT-3<sup>+</sup>, obtenidas en ambos grupos de experiencias.

Cuando se cuantificó la cantidad de células implicadas en la regulación de la síntesis de inmunoglobulinas en los pa



TABLA N° 8

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE LINFOCITOS T REGULADORES EN CULTIVO DE CELULAS CONTROL INCUBADOS CON SUERO DE PACIENTES CON NEFROPATIA DE IGA (SP) Y DE CONTROLES (SC) EN PRESENCIA DE PWM (10 ul/ml)

	<u>Cel.OKT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-4<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-8<sup>+</sup></u>	<u>OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup></u>
Controles	58.33 ± 0.49	36.27 ± 1.70	23.15 ± 1.65	1.58 ± 0.13
SC + Cont.	61.58 ± 1.63	36.82 ± 0.72	23.95 ± 0.77	1.55 ± 0.06
SP + Cont. <sup>x</sup>	59.89 ± 1.43	41.05 ± 1.49	24.40 ± 1.06	1.77 ± 0.08
p <sup>x</sup>	N.S.	0.05	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.E.$  (error estandar)  
p : Chi cuadrado.

TABLA Nº 9

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE CELULAS T REGULADORAS GENERADAS  
EN CULTIVOS DE PACIENTES INCUBADOS EN PRESENCIA DE SUEROS DE PACIEN-  
TES (SP) ALOGENICOS Y CONTROLES (SC) ESTIMULADOS CON (10 ul/ml)

	<u>Cel.OKT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-4<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-8<sup>+</sup></u>	<u>OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup></u>
Pacientes	58.89 ± 2.06	45.79 ± 0.97	26.91 ± 3.52	1.71 ± 0.09
SP + P <sup>x</sup>	60.70 ± 1.56	46.63 ± 1.14	25.27 ± 1.05	1.84 ± 0.04
SC + P <sup>xx</sup>	61.58 ± 1.63	45.86 ± 0.90	26.09 ± 2.47	1.77 ± 0.06
p <sup>x</sup>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
p <sup>xx</sup>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{X} \pm E.E.$  (error estandar de la media)

p : Chi cuadrado.

cientes tras su incubación con sueros control, no se observaron== diferencias con respecto a los porcentajes encontrados previa incubación con sueros de otros individuos afectados (Tabla 9). Estos resultados parecen indicarnos que aunque el suero de estos pacientes afecta la síntesis y diferenciación de las células reguladoras contribuyendo a la perpetuación de la enfermedad, existe un defecto intrínseco en las células participantes en la respuesta a la estimulación policlonal y que parece ser el responsable de las alteraciones inmunológicas propias de esta nefropatía.

4.2.B.3.- Modificación de la actividad y generación de células supresoras inducidas por la Con A en presencia del suero de pacientes con nefropatía de IgA

En las figuras 29, 30 y 31 se ha recogido el comportamiento dinámico de la generación de células supresoras y su actividad frente a la síntesis de inmanoglobulinas, previo -- (○□△) y tras el tratamiento del cultivo con sueros de pacientes (⊗) y controles (●■▲).

Observando las tres figuras, no aparece una diferencia en la actividad supresora de células control al ser tratadas= con sueros pertenecientes a otros individuos control. En el caso de la IgA (Fig. 29), la incubación con sueros de pacientes produce un cambio en la actividad supresora aproximándose al comportamiento observado en las células de estos sujetos. Bajas concentraciones de lectina inducen una fuerte supresión de la síntesis, que se mantiene e incluso disminuye a medida que aumenta la dosis mitogénica. La actividad supresora se independiza de la dosis inductora= a partir de 10 µg/ml de Con A.

En el caso de la IgG (Fig. 30). el comportamiento de las células tras el tratamiento con el suero de controles y pacientes es similar, manifestándose en ambos casos, frente al comportamiento normal de los controles, una falta de supresión en el límite de significación a bajas dosis de Con A. No se apreciaron diferencias en cuanto al comportamiento regulador de la síntesis de -

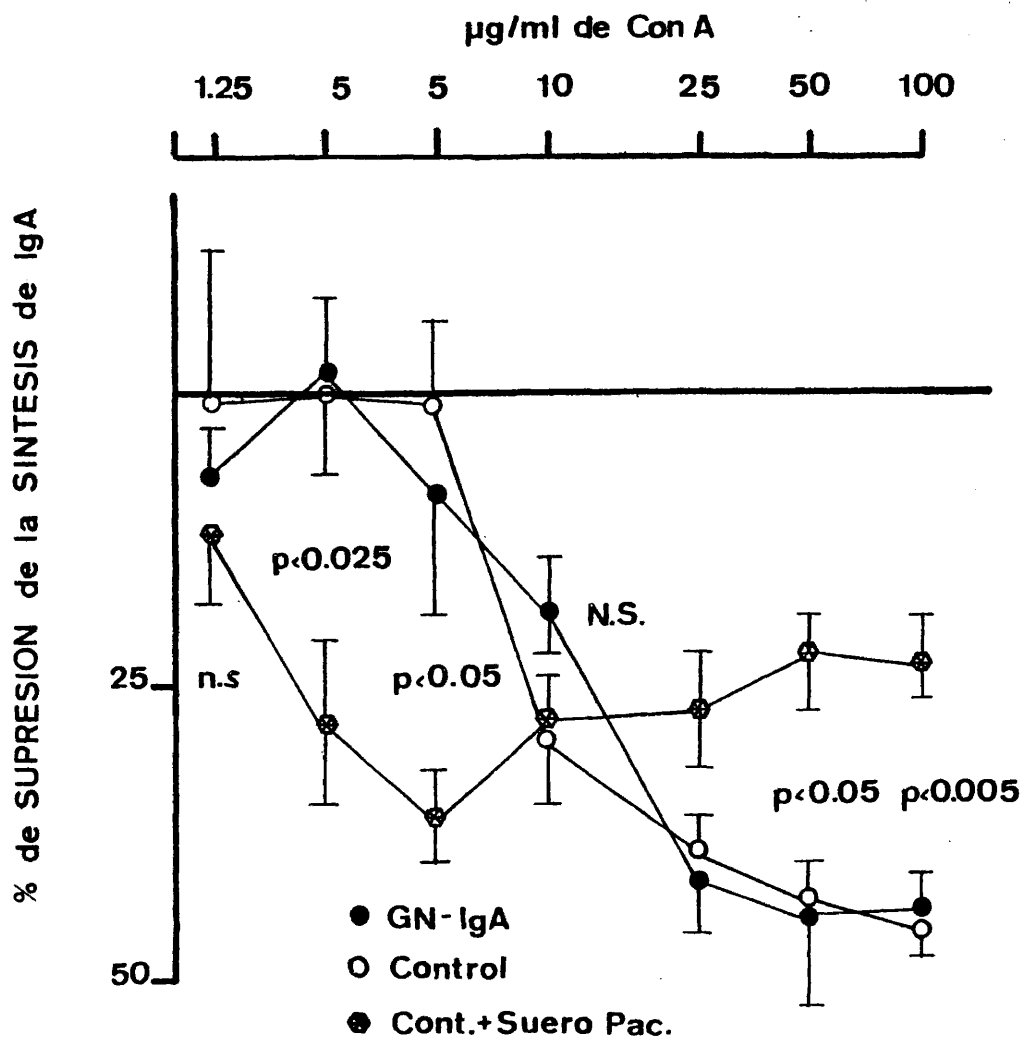


Fig.- 29

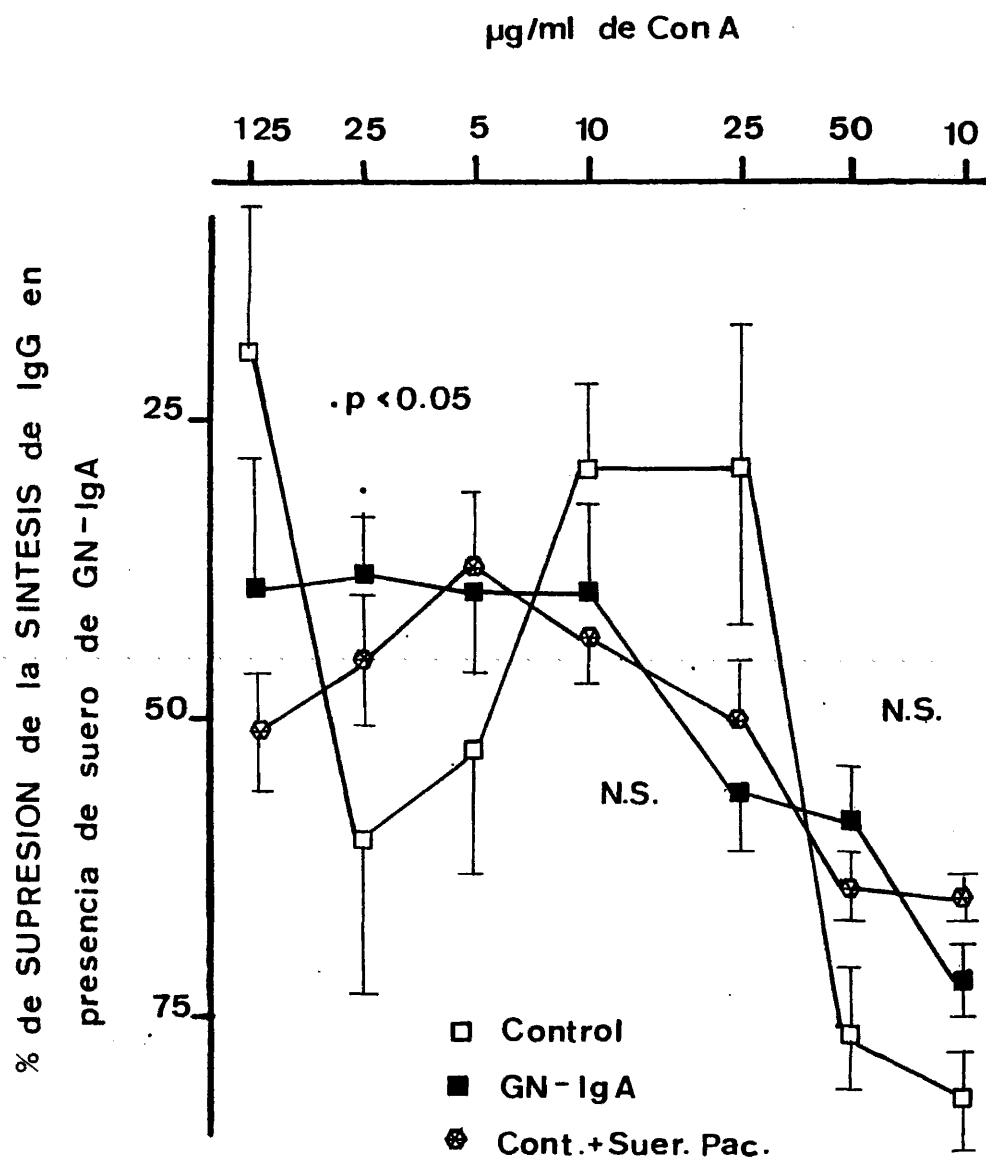


Fig.- 30

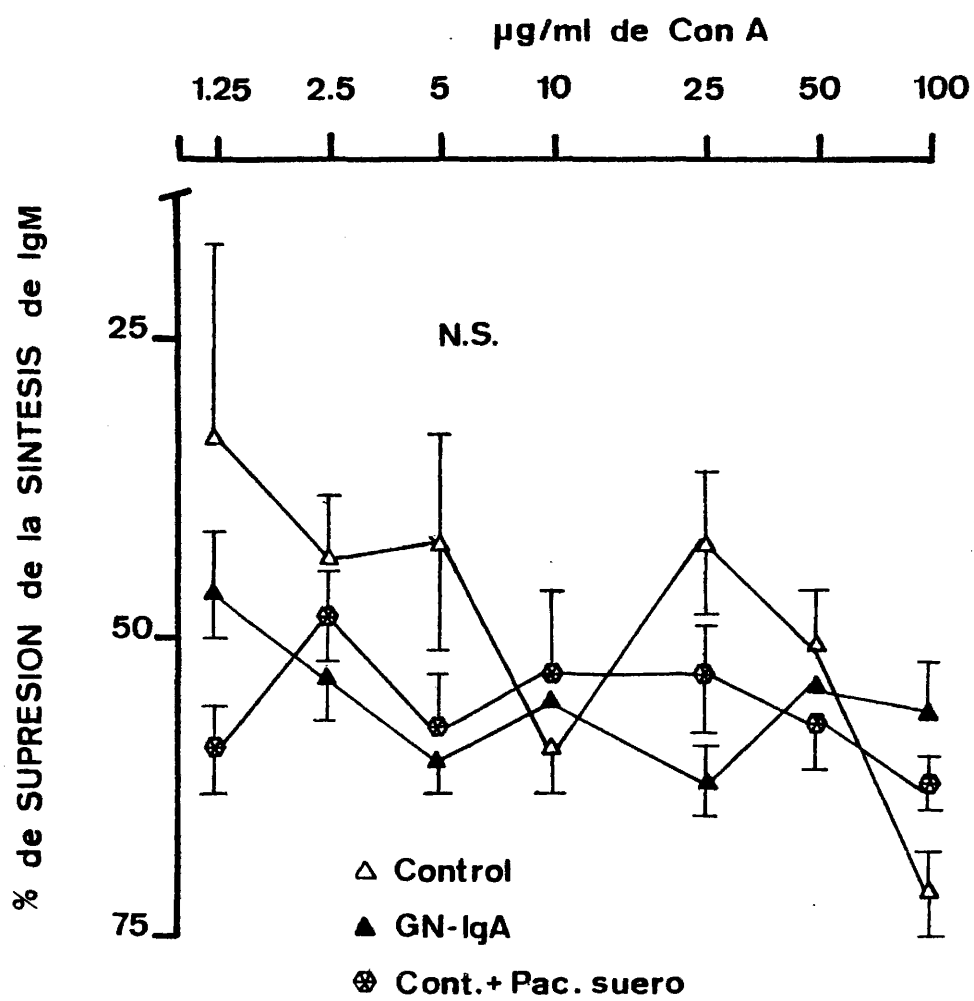


Fig.- 31

IgM (Fig. 31).

En resumen estos resultados muestran que el suero de los pacientes con nefropatía de IgA es capaz de alterar la actividad de las células supresoras normales, implicadas en el control de la síntesis de inmunoglobulinas. Este efecto es casi específico para la IgA.

El análisis de los porcentajes de células OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> tras la incubación con el suero de pacientes a distintas dosis de Con A: 50 µg/ml, 10 µg/ml y 2,5 µg/ml reveló una situación semejante a la manifestada por las células de estos individuos, aunque los porcentajes nunca llegaron a alcanzar los mismos valores.

No había diferencias significativas entre los porcentajes de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> tras el estímulo de la Con A y su situación basal, mientras que se producía una reducción significativa en los porcentajes de células OKT-4<sup>+</sup> presentes en el medio tras su incubación con el suero de los pacientes. Los porcentajes de células reguladoras antes y después de la incubación con suero de control fueron similares. (Fig. 32)

La presencia del suero de pacientes en los cultivos control produjo una independización de la generación de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> y cooperadoras OKT-4<sup>+</sup> de la dosis mitogénica utilizada. Esto determinó una profunda modificación en la proporción de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> con relación a la situación aparecida cuando las células control fueron previamente incubadas con sueros de otros controles (Fig. 33).

Estos resultados estarían de acuerdo con el comportamiento observado en la actividad supresora inducida por la ConA en presencia del suero de pacientes con nefropatía de IgA.

#### 4.2.B.4.- Efecto de la IgA monomérica, IgA polimérica e IgG, así como de sus agregados proteicos, sobre la síntesis de inmunoglobulinas

La alteración en el comportamiento de las

x10 Porcentaje de CELULAS T REGULADORAS en cultivo

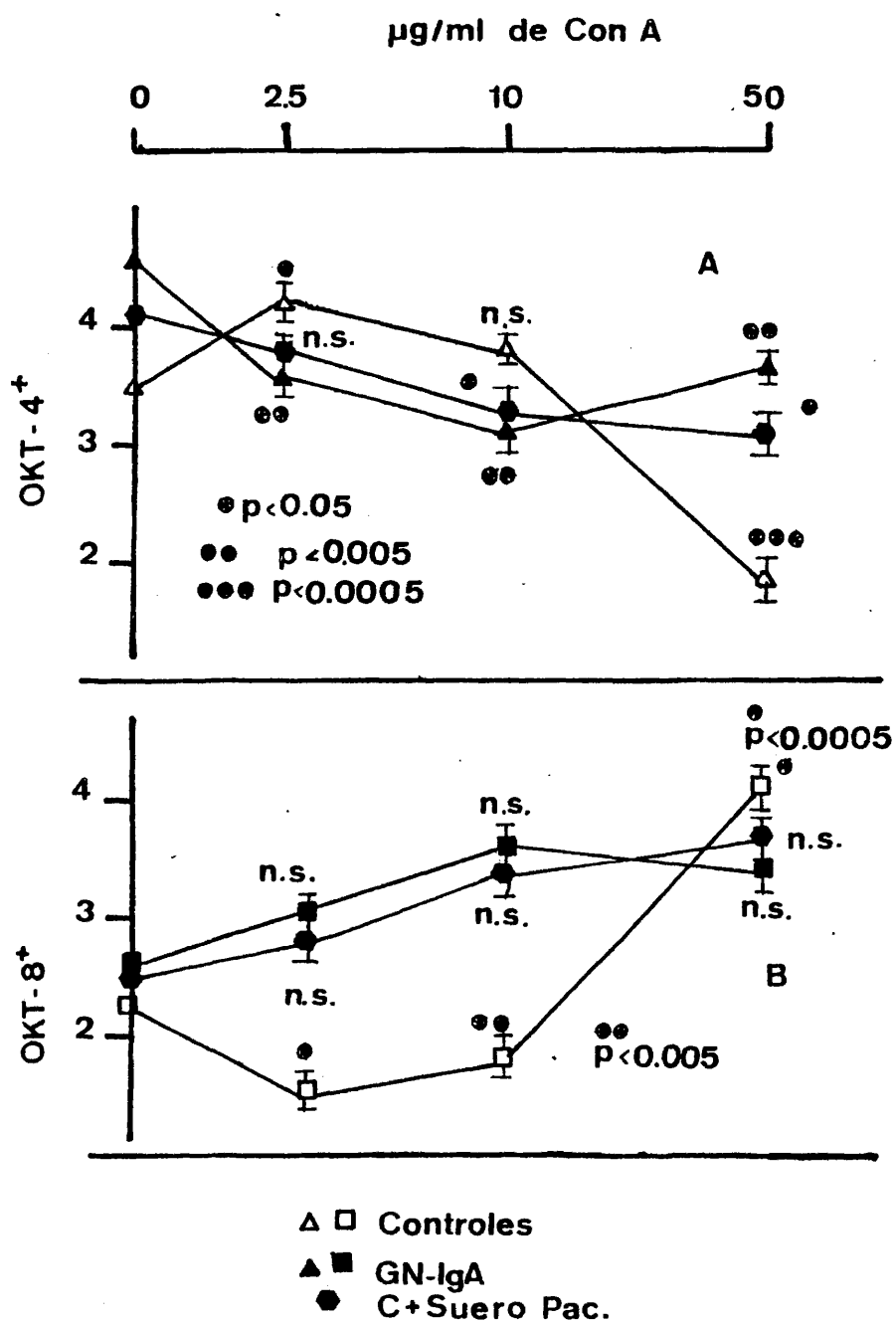


Fig.- 32



RELACION de células control OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> en cultivo, incubadas  
con sueros de PACIENTES y CONTROLES

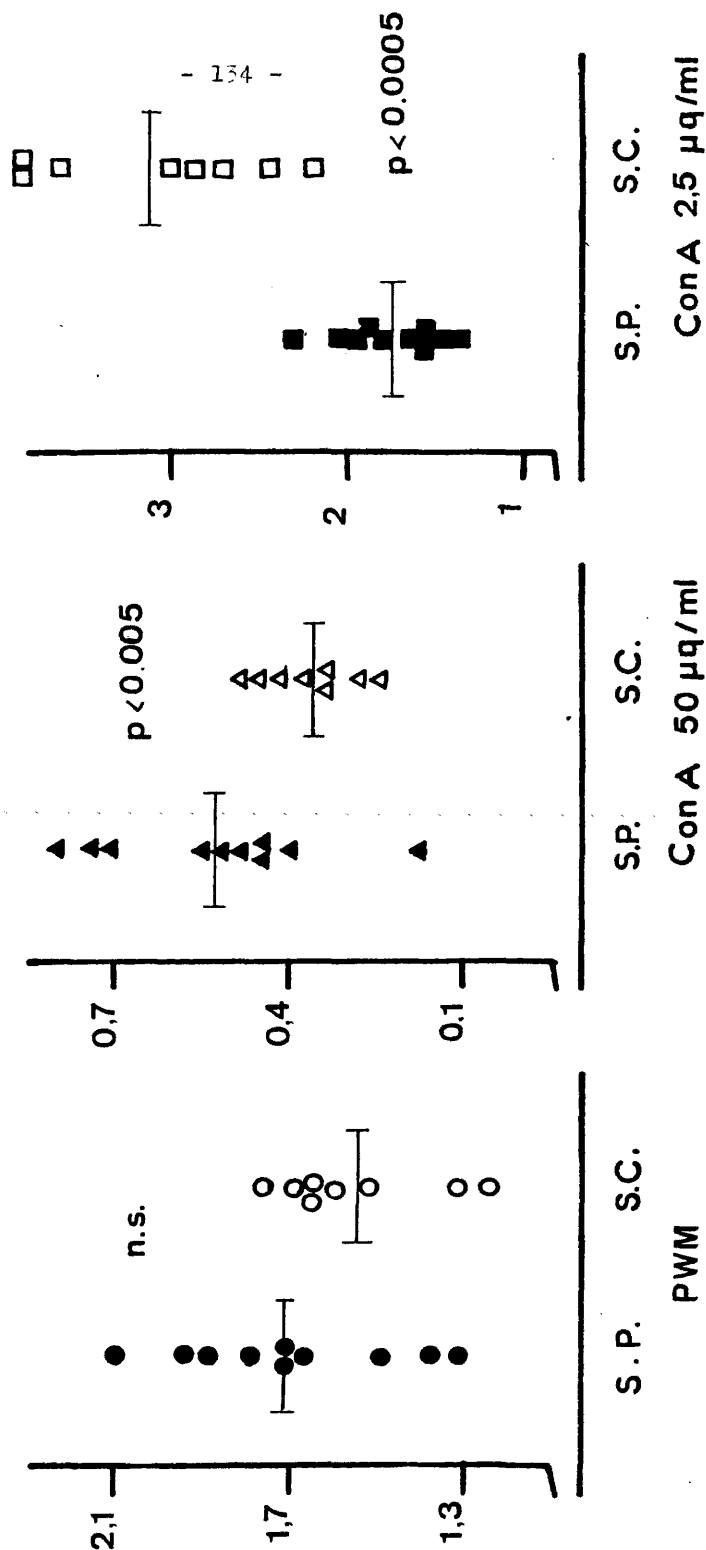


Fig.- 33

células control en presencia del suero de los pacientes con nefropatía de IgA podría ser consecuencia de la propia IgA, ya sea debido a sus niveles, a su circulación en forma de inmunocomplejos ó a sus especiales características bioquímicas. Para estudiar este punto, se incubaron las células mononucleares control obtenidas de sangre periférica con ambas formas moleculares de la IgA y agregados de estas y otras proteínas, como la IgG. La concentración utilizada fue de 250 µg/ml de proteína en todos los casos y el tamaño de los agregados osciló entre  $1-2 \times 10^6$  D.

Curiosamente no se observaron cambios en la síntesis de inmunoglobulinas, cuando se producía una alteración en la actividad supresora de las células T inducidas por la Con A bastante considerable.

La incubación con IgA monomérica no inducía ningún cambio en la regulación de la síntesis de IgA, IgG e IgM. Sólo -- agregada disminuía la actividad supresora de la síntesis de IgA -- cuando se incubaba con dosis elevadas de Con A. Por el contrario, la IgA polimérica que no afectaba la regulación de la IgM e IgG -- producía una alteración considerable de la actividad supresora para la IgA, disminuyendo significativamente a altas dosis de Con A e incrementándose a medida que disminuía la concentración. Su presencia en forma de agregados, no afectaba la regulación de la síntesis de IgM, pero disminuía la actividad supresora de IgG a bajas dosis y se mantenía por debajo de los límites normales, la supresión de la síntesis de IgA a altas concentraciones de lectina --- (Fig. 33, 34, 35).

En la incubación con agregados de IgG producía un efecto estimulador general de la síntesis de inmunoglobulinas independientemente de la dosis de Con A utilizada.

#### 4.3.- Estudios de las alteraciones celulares en familiares próximos a los pacientes con nefropatía de IgA

Aunque la nefropatía de IgA no es en principio una enfermedad hereditaria, la aparición de algunos casos en familia-

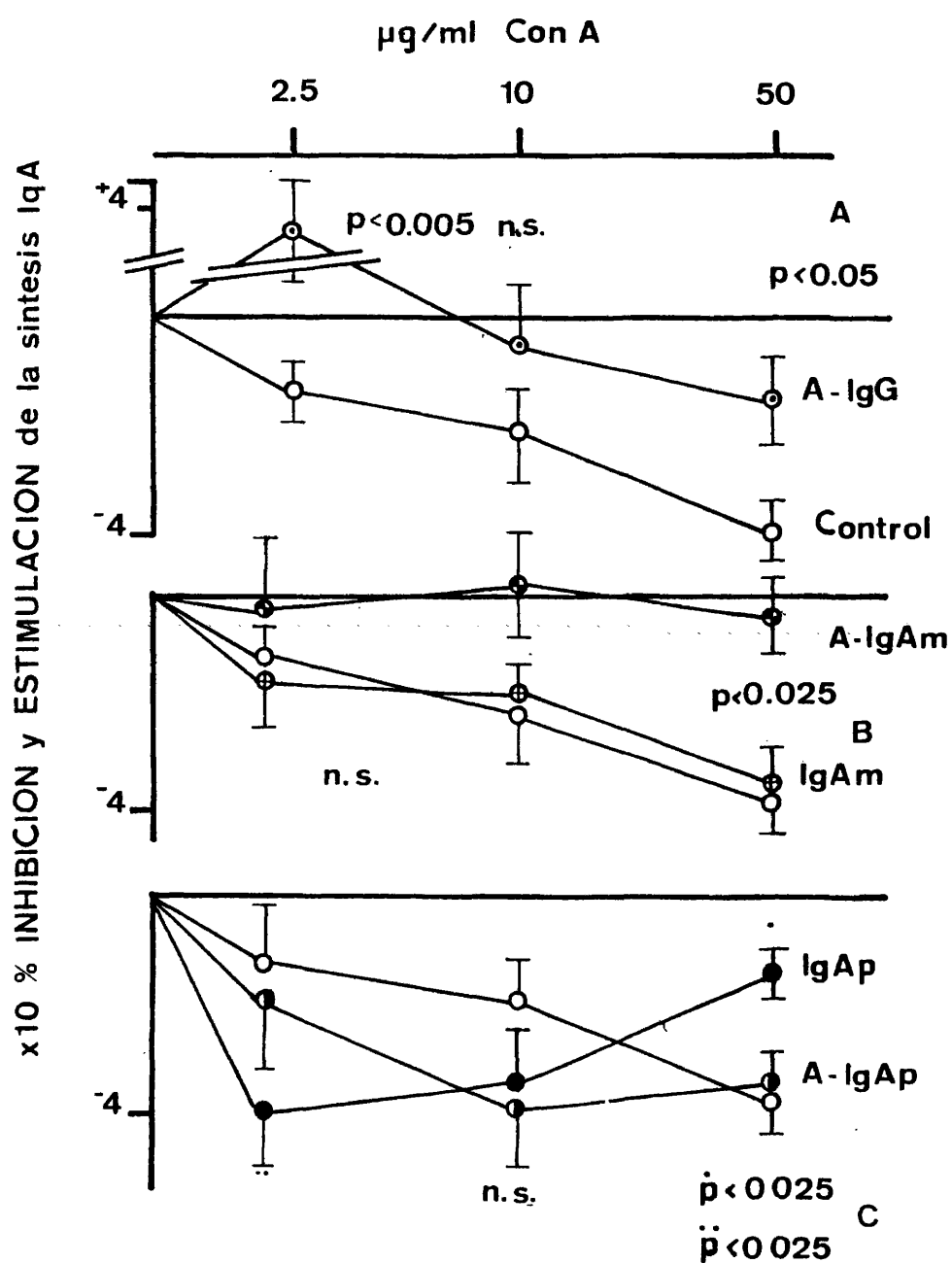


Fig.- 34

x10 % de INHIBICION y ESTIMULACION de la síntesis de IqG

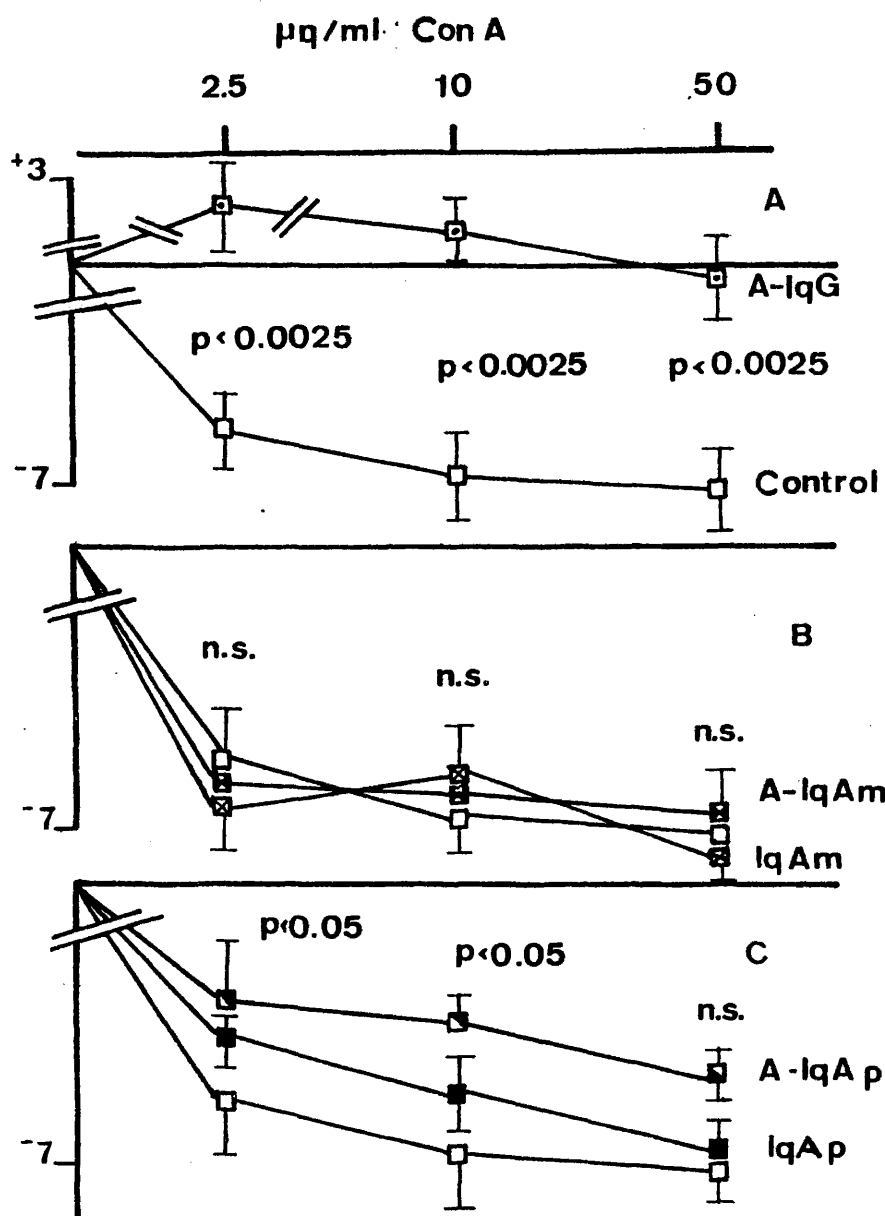


Fig.- 35

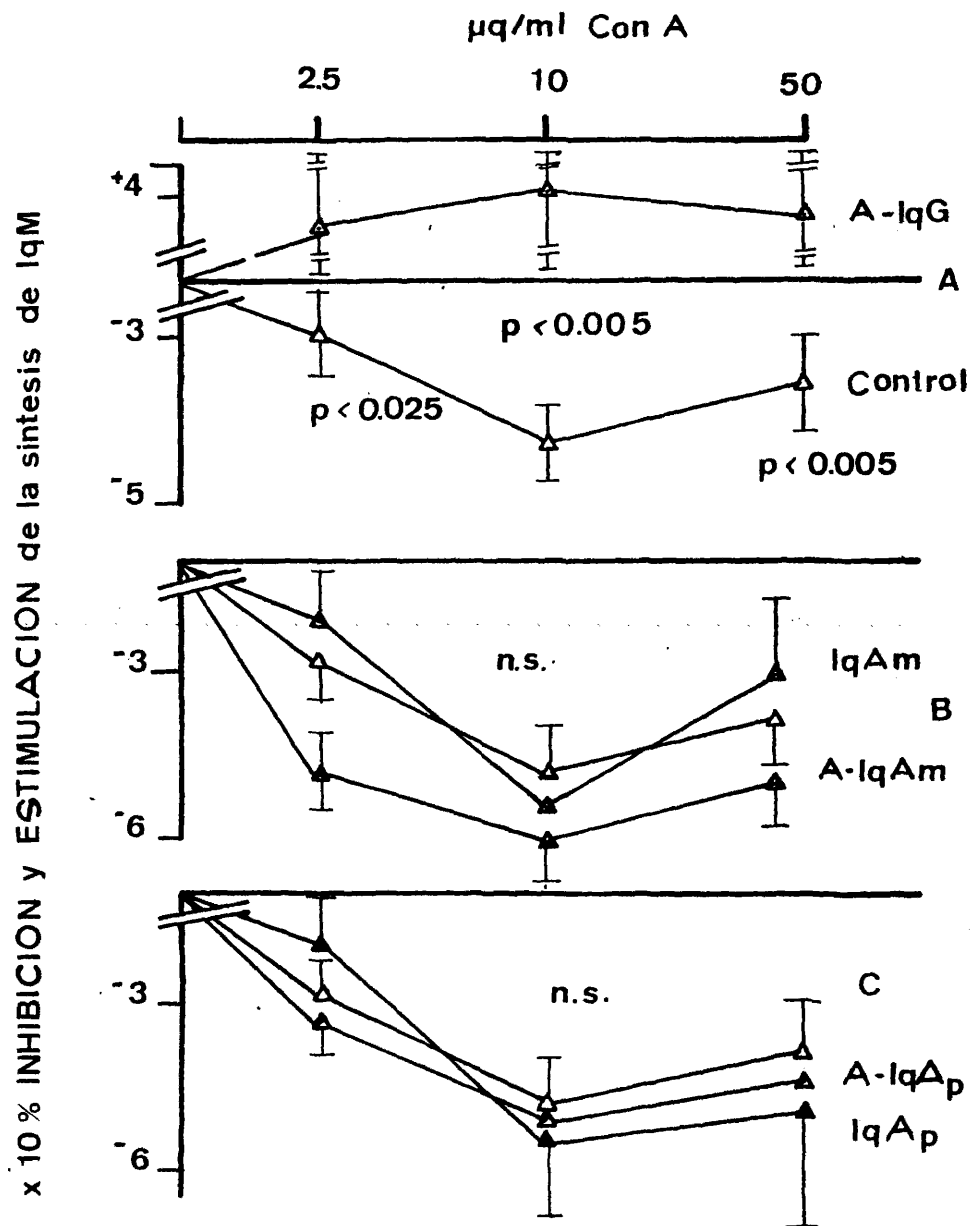


Fig.- 36

res próximos, la prevalencia de ciertos antígenos del HLA encontrados por algunos grupos principalmente el BW35, la calidad de las alteraciones celulares observadas, llevó a pensar en una posible susceptibilidad genética de estos individuos a la enfermedad. Para hacer un análisis de este punto, se estudiaron en familias con un total de 25 miembros, algunos de los parámetros más comunmente alterados en los pacientes con nefropatía de IgA.

#### 4.3.A.- Niveles séricos de inmunoglobulinas

La cuantificación mediante inmunodifusión radial de las inmunoglobulinas séricas reveló un incremento en el límite de significación de los niveles de IgA, menor que el presentado por los pacientes. No hubo diferencias en los niveles de IgG e IgM, en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 37).

#### 4.3.B.- Producción de inmunoglobulinas "in vitro" tras estimulación con PWM

De los 25 familiares estudiados, 10 presentaron un incremento de la síntesis de IgA por encima de los límites de normalidad establecidos (386-124) ng/ml, de los cuales la mitad representaba a uno de los padres estudiados. Las medias de producción resultaron significativamente mayores, en relación al grupo control ( $402 \pm 32$  versus  $255 \pm 28.68$  ng/ml), no resultando diferencias en la síntesis de IgG e IgM, en ninguno de los casos estudiados (Fig. 38).

Es curioso que en 5 de las 7 familias estudiadas, al menos uno de los padres tuviera una síntesis aumentada de IgA y en uno de los casos, este miembro padeciera junto a uno de sus hijos, la enfermedad.

No existió correlación entre los niveles séricos y los obtenidos por estimulación mitogénica "in vitro".

#### 4.3.C.- Distribución de las formas moleculares de IgA en

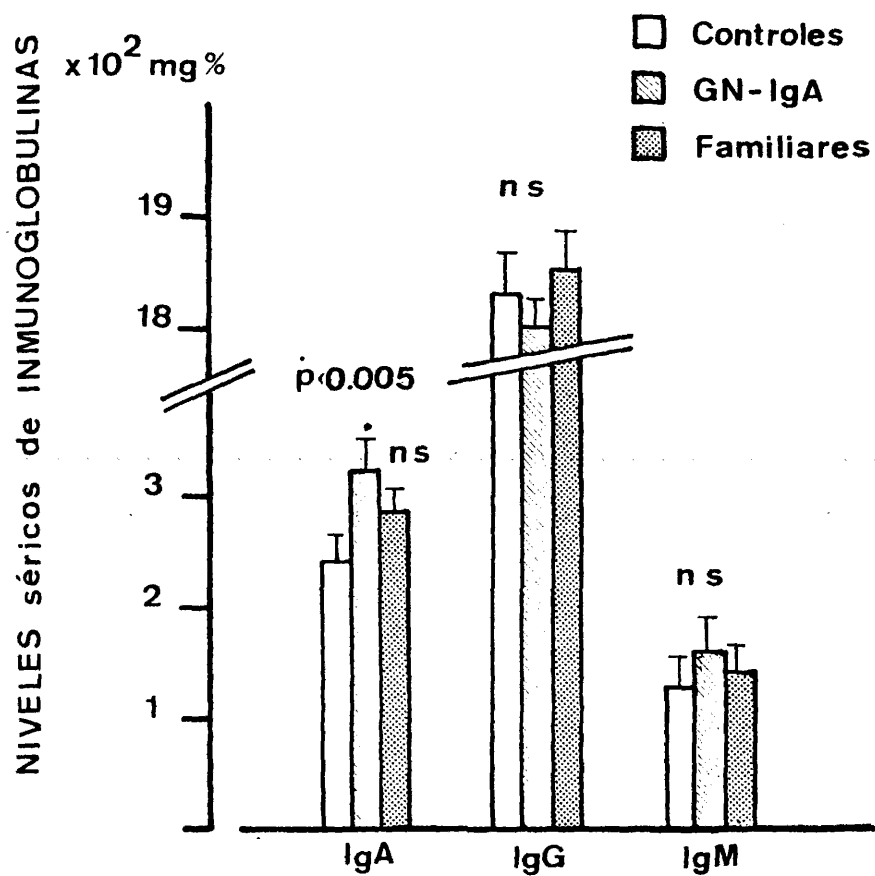


Fig.- 37

$\times 10^2$  ng/ml de IgA producida en CULTIVO de LINFOCITOS  
estimulados con PWM (10  $\mu$ l/ml)

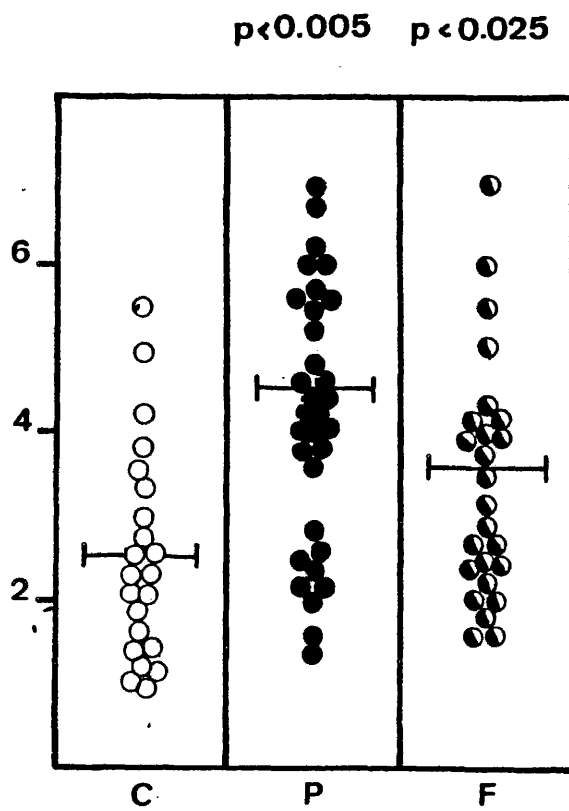


Fig.- 38



familiares de pacientes con nefropatía de IgA

Los pacientes con nefropatía de IgA no sólo tienen una elevación en los niveles de IgA sérica, sino que además presentan un incremento en la fracción polimérica de esta IgA. Análoga situación aparece cuando se estudia la síntesis "in vitro" de esta inmunoglobulina en respuesta a un estímulo policlonal.

Para determinar si en los familiares próximos aparecía esta alteración, se analizó mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad la distribución de formas moleculares de IgA en el suero de una familia de cinco miembros con dos afectados y en un grupo de familiares elegidos en función de sus concentraciones séricas de IgA. Posteriormente se hizo un estudio similar con algunos de los sobrenadantes obtenidos de un cultivo celular en presencia de PWM.

4.3.C.1.- Porcentaje de formas moleculares de IgA en el suero de familiares de pacientes con nefropatía de IgA

De los trece familiares estudiados ---- (Tabla 10), 4 presentaron un incremento en la fracción (9-13) S, correspondientes a las formas diméricas y triméricas de la IgA, a expensas de una reducción en los porcentajes de formas monoméricas acompañados de un aumento en las formas de muy alto peso molecular (13-21)S. Este desplazamiento no se correlacionaba con los niveles de IgA, que sólo en dos de los casos estaban aumentados.

El análisis de esta distribución en una familia de 5 miembros, 2 cuales estaban afectados, proporcionó un incremento en la fracción polimérica de ambos pacientes (padre e hijo) y de la madre, cuyos niveles séricos de IgA estaban elevados (Tabla 11)

4.3.C.2.- Formas moleculares de IgA en el sobrenadante de cultivos celulares estimulados con PWM

Los resultados de ultracentrifugación tam

TABLA Nº 10

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE IGA SERICA EN FAMILIARES DE PA--  
CIENTES CON NEFROPATIA SE IGA DESPUES DE LA CENTRIFUGACION DEL SUERO EN GRA  
DIENTE DE DENSIDAD A pH 7.4

Familiares	Iga ser.mg%	(5-9) S %	(9-13) S %	(13-21) S %
V.M.	350 <sup>x</sup>	55.90	32.04	12.06
V.L.	270	70.40	23.14	5.66
E.L.	270 <sup>x</sup>	75.42	21.12	3.46
G.B.	350	62.81	27.30	9.07
I.B.	240	79.45	20.15	2.36
B.F.	340 <sup>x</sup>	51.90	37.60	10.10
C.V.	240	47.30	39.70	10.46
J.N.	300	69.83	27.36	3.05
L.M.	240	73.71	23.01	3.79
J.N.	440 <sup>x</sup>	60.98	33.33	4.96
J.M.	400 <sup>x</sup>	71.83	19.65	7.51
A.R.	350 <sup>x</sup>	72.60	26.15	2.46
I.C.	300	75.40	20.49	3.41
CONTROLES (9)	242 ± 64.5	75.08 ± 3.17	21.12 ± 3.45	3.93 ± 1.82
PACIENTES (15)	335 ± 90.12	58.68 ± 13.74	32.80 ± 10.59	8.54 ± 5.20

x Valores por encima de la  $\bar{x} \pm$  DS (desviaciones estandar)

TABLA Nº 11

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE IGA EN UNA FAMILIA CON DOS MIEMBROS AFECTOS DE NEFROPATIA DE IGA TRAS LA CENTRIFUGACION DEL SUERO EN UN GRADIENTE DE DENSIDAD A pH 7.4

Familia	Iga ser.mg%	(5-9) S %	(9-13) S %	(13-21) S %
E.L. (49a) <sup>x</sup>	440 <sup>xx</sup>	52.27	39.02	8.64
V.M. (43a)	350 <sup>xx</sup>	55.90	32.04	12.06
A.L. (20a) <sup>x</sup>	370 <sup>xx</sup>	44.68	36.33	19.01
E.L. (16a)	270	75.42	21.12	3.46
V.L. (11a)	270	70.40	23.19	5.66
CONTROLES (9)	242 ± 64.5	75.08 ± 3.17	21.12 ± 3.45	3.93 ± 1.22
PACIENTES (15)	335 ± 90.12	58.68 ± 13.74	32.80 ± 10.59	8.54 ± 5.20

x Miembros afectados

xx Valores por encima de la  $\bar{x}$  + DS (desviación estandar)

poco proporcionaron una correlación entre los niveles de IgA producidos en respuesta al PWM y los porcentajes de distribución de las formas moleculares aparecidas.

De las 13 casos estudiados (Tabla 12), 7 presentaron un incremento en la fracción (9-13) S a expensas de los porcentajes aparecidos en la región (5-9) S. Cuatro de estos familiares tenían una síntesis normal de IgA en respuesta al PWM y 3 formaban parte del grupo con una distribución anómala de la IgA sérica.

Los resultados obtenidos para la familia (L.M.) comentados en el apartado anterior, reprodujeron una situación similar para los dos miembros afectados y la madre, cuya producción in vitro, era ahora normal y un incremento en la región (9-13) S para uno de los hermanos, cuya producción estaba por encima de los límites de normalidad (Tabla 13)

De estos resultados puede deducirse que el 30% de los familiares próximos a los pacientes con nefropatía de IgA presentan un incremento en la fracción polimérica de su IgA sérica, - de los que un 83% poseen un incremento de la síntesis in vitro de esta fracción.

El aumento en la síntesis de IgA polimérica aparece en el 45% de los casos correspondiendo en un 60% aproximadamente a uno de los dos progenitores.

#### 4.3.D.- Análisis de receptores celulares para el componente secretorio e inmunoglobulinas de superficie

##### 4.3.D.1.- Receptores citoplasmáticos para el componente secretorio

El porcentaje de linfocitos con capacidad para unir el componente secretorio era de un 20%, similar en los tres grupos, no existiendo tampoco diferencias en los porcentajes de células que contenían IgA, IgG e IgM. Ahora bien, el porcentaje de linfocitos que conteniendo IgA eran capaces de fijar componente secretorio en relación al número total de células IgA<sup>+</sup>, estaba significativamente incrementado en los familiares de estos pa-

TABLA Nº 12

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE IgA PRODUCIDA EN CULTIVO DE FAMILIARES DE PACIENTES CON NEFROPATIA DE IgA TRAS SU CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DENSIDAD A pH 7.4

<u>Familiares</u>	<u>IgA ser. mg%</u>	<u>IgA (cul.) mg/ml</u>	<u>(5-9)S %</u>	<u>(9-13)S %</u>	<u>(13-21)S %</u>
V.M.	350 x	260	29.73	66.32	3.95
V.L.	270	150 x	30.22	65.73	4.05
E.L.	270 x	395	41.60	55.40	3.00
G.B.	350 x	155	45.60	51.39	3.01
I.B.	240 x	250	22.40	70.86	6.74
B.F.	340 x	275 x	39.90	58.20	1.90
G.V.	240	410 x	26.83	69.20	4.32
J.N.	300	390 x	48.72	50.21	1.07
L.M.	240 x	350 x	29.62	68.72	1.66
J.N.	440 x	500 x	25.63	71.39	2.98
J.M.	400 x	275 x	43.61	49.62	6.78
A.R.	350 x	750 x	49.86	50.30	0.22
I.C.	300	206	45.50	52.90	3.75
CONTROLES (6)	242 ± 64.5 <sup>x</sup>	255 ± 131 <sup>x</sup>	47.62 ± 4.68 <sup>xx</sup>	50.89 ± 2.60	3.09 ± 1.95

x Valores medidos por encima de la  $\bar{x}$  ± D.S.

TABLA Nº 13

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PORCENTAJES DE IGA PRODUCIDA EN CULTIVO EN UNA -  
FAMILIA CON DOS MIEMBROS AFECTOS DE NEFROPATIA DE IGA TRAS SU CENTRIFUGACION  
EN GRADIENTE DE DENSIDAD A PH 7.4

Familiares	IgA ser.mg%	ng/ml IgA cul.	(5-9) S %	(9-13) S %	(13-21) S %
E.L.(49a) <sup>x</sup>	xx440	550 <sup>xxx</sup>	35.70	60.90	4.22
V.M.(43a) <sup>x</sup>	xx350	260	28.73	66.32	3.95
A.L.(20a) <sup>x</sup>	xx370	375 <sup>xxx</sup>	33.25	63.90	2.65
E.L.(16a)	270	395 <sup>xxx</sup>	41.60	55.40	3.00
V.L.(11a)	270	150	30.22	65.73	4.05
CONTROLES (6)	242 ± 64.5	255 ± 131	47.62 ± 4.68	50.89 ± 2.60	3.09 ± 1.95

- 147 -

x Afectos de nefropatía de IgA  
xx Distribución sérica anómala de IgA  
xxx Valores por encima de la  $\bar{x}$  ± D.S.

cientes. No ocurría así en el caso de células IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>.

En la figura 39 puede observarse que de los 25 familiares estudiados sólo 10 están dentro de los límites normales. De los 15 que poseen alteración, 7 corresponden a los progenitores no habiéndose podido establecer en ningún caso, ningún tipo de correlación entre estos datos, los valores in vivo e in vitro de IgA y el porcentaje de formas de alto peso molecular presentes.

#### 4.3.D.2.- Inmunoglobulinas de superficie

Los familiares próximos a los pacientes tienen un porcentaje mayor ( $p < 0.005$ ) de linfocitos portadores de IgA -- (Fig. 40) en su superficie.

La unión del componente secretorio a las inmunoglobulinas de superficie fue menor de un 5%, correspondiendo la mayor parte a linfocitos portadores de IgM. A pesar de esto, la proporción de linfocitos portadores de IgA polimérica, frente a los portadores de IgA total, se elevó considerablemente, manteniéndose dentro de los límites de normalidad establecidos.

No hubo diferencias en los niveles de células portadoras de IgG e IgM, ni en las proporciones que fijaban el CS, con respecto al grupo control, siendo la alteración observada específica para la población IgA<sup>+</sup>.

El aumento en el número de linfocitos portadores de IgA iba acompañado en el 80% de los casos, de un aumento en el número de linfocitos sintetizadores de IgA polimérica.

#### 4.3.E.- Actividad supresora inducida por la Con A, en los familiares de pacientes con nefropatía de IgA

Se estudió la actividad de las células supresoras inducidas por la Con A a tres concentraciones diferentes: 50 µg/ml, 10 µg/ml y 2,5 µg/ml, según el método de Miller.

A 10 µg/ml no se observaron diferencias entre los grupos de pacientes, controles y familiares. Tampoco aparecieron

x 10 Porcentaje de Linfocitos sintetizadores de IgA  
con RECEPTORES CITOPASMATICOS para el CS

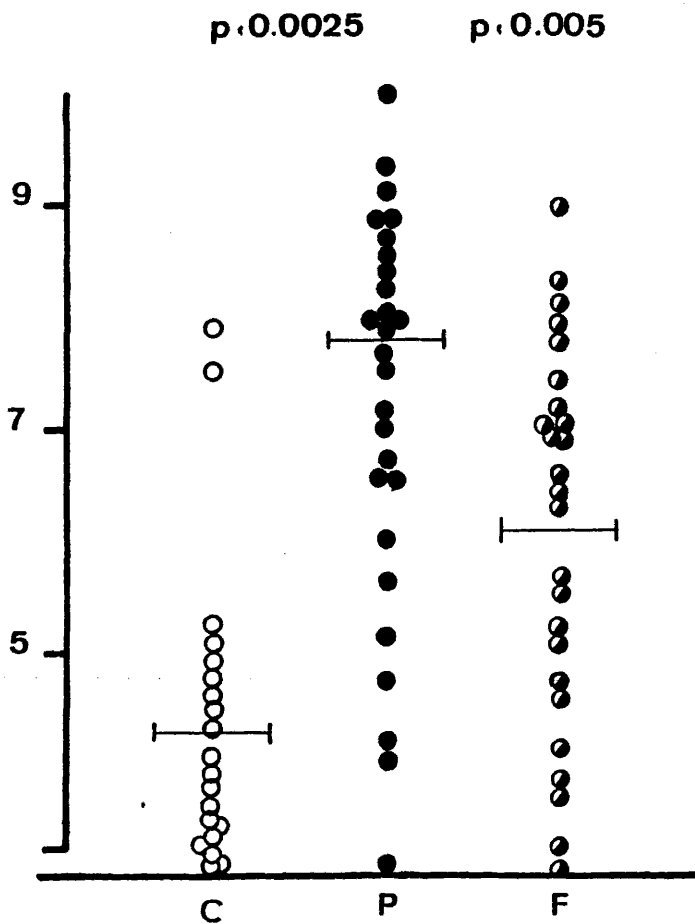
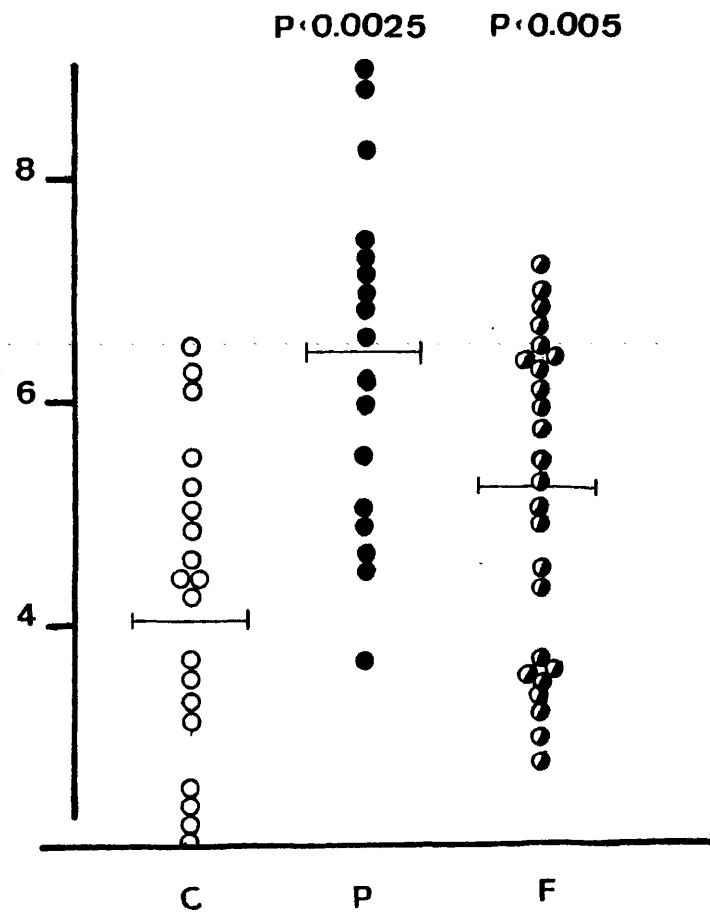


Fig.- 39



Porcentaje de IgA de SUPERFICIE sobre LINFOCITOS  
estimulados con PWM



a esta ni a las otras concentraciones en el caso de la IgG e IgM=

A una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ , sólo 8 de los 25 familiares estudiados presentaron una disminución en la capacidad supresora de la síntesis de IgA, mientras que este efecto se observaba en 17 de los 23 pacientes analizados (Fig. 41).

Cuando la concentración utilizada fue de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  se produjo una fuerte supresión de la síntesis de IgA dentro del rango alcanzado por los pacientes, en la que estaban implicados el 70% de los familiares estudiados.

Es curioso destacar, la especificidad de este comportamiento para la IgA y la falta de correlación con los parámetros estudiados hasta el momento.

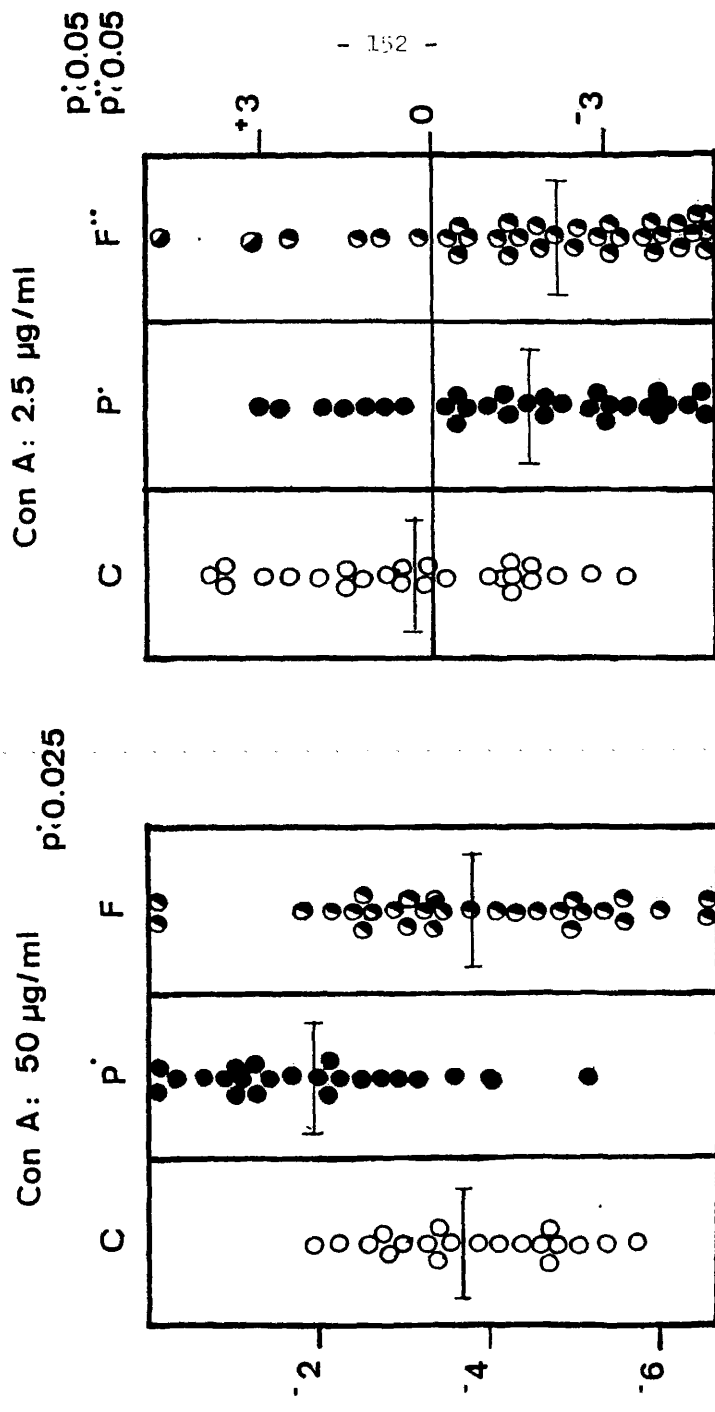
#### 4.3.F.- Cuantificación de poblaciones T reguladoras de la síntesis de inmunoglobulinas in vitro.

El análisis de los porcentajes de células T totales, T cooperadoras y T supresoras mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos reveló que no existían diferencias en el porcentaje de linfocitos T totales OKT-3<sup>+</sup> con relación al grupo control. Tampoco aparecieron diferencias en el índice de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup>, con unos niveles normales de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> y un incremento significativo en el porcentaje de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>, sin alcanzar el obtenido en los pacientes (Tabla 14).

La diferencia entre el porcentaje de células T totales y la suma de los porcentajes de células OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> fue de un 10% hablando en favor de la presencia de una población celular con ambos marcadores en su superficie, análoga a la que parece existir en nuestros pacientes, que podría estar implicada en las diferencias de regulación observadas en estos individuos.

Más importante que el estudio en conjunto, es el análisis individual de los datos. Así 11 de 26 pacientes tenían un aumento de las células cooperadoras (por encima de la  $\bar{x} \pm 2\text{D.S.}$ ) Así mismo, 8 de los 26 familiares tenían un incremento de las cé-

Fig.- 41



x10 Porcentaje de Supresión y Estimación de la síntesis de IgA (10µl /ml PWM)

TABLA Nº 14

VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES DE CELULAS T REGULADORAS EN CULTIVOS DE --  
CONTROLES , PACIENTES CON NEFROPATIA DE IGA Y SUS FAMILIARES

	<u>Cel.OKT-3<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-4<sup>+</sup></u>	<u>Cel.OKT-8<sup>+</sup></u>	<u>OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup></u>
Controles (23)	56.36 ± 1.42	35.47 ± 0.19	24.16 ± 0.72	1.47 ± 0.05
Pacientes <sup>x</sup> (27)	57.77 ± 1.44	45.35 ± 0.42	26.34 ± 1.18	1.76 ± 0.06
Familiares <sup>xx</sup> (25)	56.18 ± 1.12	39.58 ± 1.10	26.14 ± 0.96	1.54 ± 0.05
$p^x$	N.S.	0.0005	N.S.	0.005
$p^{xx}$	N.S.	0.0025	N.S.	N.S.

Valores recogidos :  $\bar{x} \pm e.e.$  (error estandar de la media)  
p : Chi cuadrado

lulas supresoras. Esto junto con la existencia de niveles persistentemente elevados de células OKT-4<sup>+</sup> en pacientes, habla en favor de un trastorno primario de linfocitos T cooperadores. La existencia de 8 familiares con incremento de células T supresoras, frente a 7 de 27 pacientes sugeriría un intento compensador de los linfocitos T supresores para evitar la excesiva producción de IgA con un ulterior agotamiento del sistema, ya en el comienzo ó en ciertas fases de la enfermedad.

Por último, es interesante destacar que en las 7 familias estudiadas, siempre había uno de los padres con alguna de las alteraciones inmunológicas discutidas. Del mismo modo, aparecían afectados uno ó dos de los hermanos. Aunque no ha formado parte de este trabajo, es curioso hacer notar que ninguno de los parientes han presentado inmunocomplejos de IgA e IgG por dos técnicas distintas (células Raji y/o inhibición de la fijación de IgA a un antisuero anti-IgA de baja afinidad. Estos datos plantean un reto importante a la hora de dilucidar la importancia de estos inmunocomplejos en la aparición y desarrollo de la nefropatía de IgA.

# DISCUSIÓN



## 5.- DISCUSION

La nefropatía de IgA, descrita como tal entidad por Berger en 1969 (10), se caracteriza fundamentalmente por la presencia en el mesangio renal de IgA y frecuentemente C3 en un modelo de depósito granular.

La patogénesis de esta enfermedad es prácticamente desconocida. La presencia de elevados niveles de IgA en el suero (39) y su recidiva tras el transplante renal (11), llamó la atención sobre el papel que podría jugar esta inmunoglobulina. Pero hasta 1979 con el descubrimiento de elevados niveles séricos de IgA polimérica, parcialmente en forma de inmunocomplejos en la mayoría de los pacientes (45), no se consideró a la IgA como un factor importante e incluso decisivo en su desarrollo.

En este trabajo hemos demostrado claramente que los pacientes con nefropatía de IgA presentan un conjunto de alteraciones en el comportamiento de las células implicadas en la respuesta inmune, que pueden en parte explicar alguno de los hechos inmunopatológicos característicos de esta enfermedad.

Primeramente hemos demostrado que los linfocitos de sangre periférica estimulados con PWM producen selectivamente mayor cantidad de IgA en relación a los controles. Este resultado estaría de acuerdo con el aumento específico de linfocitos portadores de IgA en su superficie (126) y la disminución de la actividad supresora de las células T (192) de estos pacientes encontradas recientemente por otros grupos. Un estudio detallado de los sobrenadantes del cultivo demostró que una gran parte de la IgA producida tenía características bioquímicas de IgA polimérica. Estos datos junto con el elevado porcentaje de células que contenían cadena J en su citoplasma y eran productoras de IgA, y a su vez unían componente secretorio, debían explicar en parte los altos niveles de IgA polimérica en el suero de estos pacientes (101)

La naturaleza y origen de la IgA depositada en el mesangio renal en esta nefropatía aún no ha sido completamente dilucidada. La alta frecuencia de hematuria macroscópica asociada a



infecciones del tracto respiratorio superior en estos pacientes - sugirió las secrecciones externas como un posible origen para la IgA depositada. Sin embargo, los intentos realizados hasta el momento para demostrar IgA secretoria ó procedente de las secrecciones (IgA1/IgA2) han fracasado (34, 181) ó son muy contradictorios (4, 26, 104). Recientemente (19, 20), basándose en la fijación específica del componente secretorio a las inmunoglobulinas conteniendo cadena J, se ha demostrado que la IgA depositada en el glomerulo renal es polimérica en la mayoría de estos pacientes, independientemente de que provenga de las secrecciones ó de la periferia (9, 39). Como menos de un 10% de las células plasmáticas de la médula ósea son capaces de unir componente secretorio (71, 140), -- mientras que el 50% de las células plasmáticas formadoras de IgA en la mucosa intestinal y de los linfocitos periféricos estimulados con PWM (17, 18, 30, 92) lo unen, se podría aceptar que los altos niveles de IgA polimérica sérica y la propia IgA localizada en el mesangio, esten originadas en los linfocitos con capacidad migratoria provenientes de las secrecciones externas.

La alta producción de IgA polimérica tras la estimulación policlonal de los linfocitos "in vitro" no puede explicar por sí misma el incremento en la fracción polimérica sérica de los pacientes con esta enfermedad (102). Los bajos niveles de IgA polimérica encontrados en el suero de sujetos normales frente a la alta proporción de esta forma molecular producida por los linfocitos estimulados in vitro, se debe en parte a su rápido y efectivo aclaramiento por el hígado, probablemente a través de los receptores para el componente secretorio presente en los hepatocitos (65, 76, 96, 131, 158). En teoría, un defecto en el aclaramiento de la IgA por el hígado como sucede probablemente en los pacientes con cirrosis alcohólica, en los que aparecen elevados niveles de IgA polimérica sérica (102), contribuiría a explicar los hallazgos en el suero de nuestros pacientes. La retención de IgA observada en ratas con ligadura de los conductos biliares (131) ó daño hepático (83) y la dificultad en el aclaramiento de agregados de IgA inyectados en ratones en un modelo de cirrosis crónica experimental

confirman esta hipótesis.

Es posible que los linfocitos originados en los tejidos asociados a las secreciones externas produzcan una mayor cantidad de IgA polimérica tras una infección viral, tal como ocurre in vitro por estimulación policlonal. Esta IgA formando parte de inmunocomplejos podría teóricamente saturar los receptores para el componente secretorio y probablemente Fc de los hepatocitos, permaneciendo más tiempo en circulación y favoreciendo su depósito a nivel glomerular. En esta misma línea, se ha demostrado en la ratona la eliminación específica a través del hígado de los inmunocomplejos de IgA polimérica (134) y una mayor dificultad para el manejo de agregados de IgA por el sistema mononuclear fagocítico en relación a los agregados de IgG (45)

El papel inmunopatogénico de la IgA polimérica en esta nefropatía no está claro. En un modelo de nefropatía experimental recientemente descrito, la presencia de inmunocomplejos de IgA polimérica era crítica para su depósito y la inducción de lesiones histológicas nefróticas. El hecho de que este tipo de inmunocomplejos aparezcan en el suero y riñones de pacientes con nefropatía de IgA, síndrome de Schönleichen Henoch y cirrosis hepática -alcohólica con depósitos de IgA a nivel renal, sugiere una situación similar en el hombre. Además, la disminución en los niveles séricos de IgA polimérica en algunos pacientes tratados con difenilhidantoina, coincide con una mejoría clínica e histológica (40-42).

La producción elevada de IgA polimérica y la alta proporción de células implicadas en su biosíntesis nos indujo a pensar en la cadena J, como un factor determinante del proceso. De hecho, nuestros pacientes presentaban un incremento en el número de linfocitos aislados de sangre periférica que contenían cadena J en su citoplasma, con una proporción semejante de células IgA<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> en su citoplasma, al del grupo control. Estos resultados indicaban a priori un trastorno en la biosíntesis de la cadena J. La estimulación "in vitro" con el PWM, descartó esta posibilidad. El incremento en el número de células cadena J<sup>+</sup> se man

tenía en relación a los controles. Se producía una síntesis paralela de inmunoglobulinas, que conducía a una distribución de células sintetizadoras de IgA, IgG e IgM similar en ambos grupos. Pero mientras que los porcentajes de células sintetizadoras de IgG e IgM que contenían cadena J disminuían en la misma proporción -- que los controles, con respecto a su situación basal, los porcentajes de células cadenaJ-IgA<sup>+</sup> no se modificaban y permanecían sensiblemente aumentados con relación al mismo grupo.

La síntesis de cadena J corre paralela in vitro a la síntesis de inmunoglobulinas en linfocitos estimulados con PWM (109). Esta proteína no sólo media el proceso de intercambio de puentes disulfuro entre los monómeros en la polimerización, sino que juega un importante papel en el ensamblaje de las cadenas integrantes de la molécula de inmunoglobulina (109, 110). Su presencia se consideró en un principio restringida a células secretoras de inmunoglobulinas (18, 84). Más tarde se detectó en varias líneas celulares mieloides carentes de la síntesis de cadenas pesadas ó ligeras (86, 152) y en el retículo endoplásmico rugoso de células B portadoras de inmunoglobulinas en su superficie (123). Muy recientemente se comprobó que su biosíntesis es un suceso temprano en la ontogenia de células B anterior al desarrollo de la fase secretora (105), confirmando la hipótesis de Brandtzaeg y col. (1974) sobre el carácter de marcador de inmunocitos de la cadena J en los primeros estadios de la diferenciación celular.

Con estos precedentes, el aumento en la proporción de células cadena J y cadena J-IgA<sup>+</sup> en nuestros pacientes con un contenido similar de células IgA<sup>+</sup> al del grupo control, apuntaría un posible trastorno en la maduración y diferenciación de algunos clones implicados en la síntesis de esta inmunoglobulina. El alto contenido en cadena J reflejaría un aumento en el número de precursores celulares B con una alta susceptibilidad a la respuesta de IgA y una cierta incapacidad para alcanzar estadios de diferenciación tardíos como sería la secreción de IgA monomérica, IgG y el desarrollo de una respuesta generalizada normal a la activación policlonal (186).

La hiperactividad de estos clones para la síntesis de IgA frente a un estímulo antigénico supone un incremento en la disponibilidad de monómeros y cadenas pesadas de cuyo ensamblaje y polimerización es responsable la cadena J (109). Si esta proteína actúa como han indicado algunos autores (110), limitando el grado de polimerización espontánea concomitante al incremento en la síntesis de inmunoglobulinas y en consecuencia de centros activos de polimerización, su alta proporción en nuestros pacientes sería una consecuencia natural de un defecto intrínseco de un grupo de linfocitos B responsables del aumento en la síntesis de IgA polimérica observada.

No existe en la literatura ningún trabajo sobre el papel modulador de la cadena J en la síntesis directa de inmunoglobulinas. Dado su carácter de marcador de diferenciación que -- tiende a perderse en los últimos estadios de proceso, es lógico pensar que el control génico de esta proteína este ligado a la expresión diferencial de los genes implicados en la síntesis de los diferentes isotipos (72). Cualquier factor que incida sobre la cadena J debe afectar en alguna medida la biosíntesis de inmunoglobulinas.

Nosotros hemos observado que aunque la cadena J sólo se ha detectado sobre la superficie de un 0.98% de las células linfoides de sangre periférica (19), la adición de un suero anticadena J humana a un cultivo celular determina un cambio total en la biosíntesis de IgA e IgM inducidas con PWM, dejando prácticamente inalterada la síntesis de IgG

Estudios similares, previamente recogidos en la literatura, realizados con sueros anti-IgA y anti-cadenas Y y  $\mu$ , han puesto de manifiesto que estos anticuerpos bloquean el paso de células secretoras de IgG durante la diferenciación de linfocitos B (51, 175). Los estadios iniciales de diferenciación ó activación son más fácilmente estimulados que los estadios finales (51). De hecho, se ha observado que bajas concentraciones de suero anticadena  $\mu$  estimulan la síntesis de IgM, mientras que este efecto no aparece nunca para la IgA e IgG en las mismas condiciones, cuya -

síntesis inducida por PWM se produce concomitante más que secuencialmente en el hombre (139). La supresión de la secreción de inmunoglobulinas tiene un momento crítico. Una vez que las células se han comprometido en la biosíntesis de un isotipo determinado, estos anticuerpos no ejercen ningún efecto (175). Lo mismo sucede cuando a penas se ha iniciado la diferenciación y el pequeño efecto observado es totalmente reversible, quizás debido a que la activación de supresores ha comenzado, pero no han aparecido aún células comprometidas en un sentido determinado (223). El efecto de estos sueros depende de la fracción  $F(ab')_2$  del anticuerpo y no parece estar condicionado por el proceso de reagrupación y endocitosis del complejo formado sobre la superficie (51).

Curiosamente hemos observado que las células control en estadios más tempranos de la diferenciación como son las implicadas en la síntesis de IgM donde la proporción de células - conteniendo cadena J es más elevada, son más susceptibles a la estimulación en presencia del suero anti-cadena J. Las células totalmente comprometidas en la síntesis de un isotipo determinado propio de los últimos estadios de diferenciación, como es la IgG no se afectan y en la propia IgA, la estimulación se produce a muy bajas concentraciones de anticuerpo. El efecto estimulador aparece a concentraciones que no influyen sobre la síntesis de IgG e IgM y parece específico para esta inmunoglobulina. Quizás, dado el carácter intermedio en la diferenciación que se ha postulado para la población implicada en la síntesis de IgA, fuese una manifestación similar a la aparecida para la IgM a dosis más elevadas. Esta célula estaría más capacitada para recoger a una concentración alta de anticuerpo no sólo su efecto mitogénico, sino responder a los cambios de membrana que inducirían una elevación del AMPc, desencadenando una respuesta celular que conduciría a la inhibición de la proliferación de este grupo poblacional (47,133). El hecho de que la IgG no aparezca en forma polimérica y la cadena J sólo participe aparentemente en el ensamblaje de las unidades del monómero y en muchos casos ni siquiera este presente, junto a su elevado grado de diferenciación, explicaría la falta de respuesta de la -

población implicada en su síntesis en presencia del suero anti-cadena J humana. Posiblemente el control genético de la cadena J sea a este nivel independiente de algunos factores que parecen influir en poblaciones menos diferenciadas.

Es posible que el efecto del suero anticadena J este condicionado a su recepción en ciertas localizaciones de la membrana muy próximas ó implicadas en el transporte activo de las inmunoglobulinas, más que sobre las propias moléculas poliméricas de la superficie, en las que los determinantes antigénicos del péptido no son accesibles. No hay que olvidar que algunos autores han propuesto a la cadena J como un elemento necesario para el transporte de las inmunoglobulinas al exterior (136). De hecho, su incorporación a la IgM se produce instantes antes de su liberación ó concomitante con ella, por lo que la proteína debe localizarse en un punto muy próximo ó incluso sobre la membrana interna de la célula.

Centrándonos en la respuesta obtenida para nuestros pacientes con nefropatía de IgA, lo que a primera vista llama la atención es el comportamiento invertido de la síntesis de IgA e IgM en función de la concentración del antisuero, en relación a los controles. Si como hemos apuntado, los estadios iniciales de diferenciación son más susceptibles a las variaciones de AMPc y en consecuencia a la proliferación y diferenciación ante un estímulo policlonal, la poca modificación observada en la síntesis de IgM reflejaría un desplazamiento de las células a estadios de diferenciación posteriores con una menor respuesta al anticuerpo ó bien un cambio en la membrana que impidiera una mayor activación mitogénica de la célula (51). El drástico cambio en el comportamiento para la síntesis de IgA y la similitud con el grupo control en la síntesis de IgG, abogan por un defecto intrínseco en la diferenciación de linfocitos B secretores de IgM a secretores de IgA y en el paso de este estadio a linfocitos B secretores de IgG. La mayoría de las células diferenciadas para IgA no alcanzan la fase de células IgG ó la anomalía sólo afecta al control genético de la IgG si consideramos una síntesis concomitante en el hombre. --

La alteración no sería general y la diferenciación aberrante afectaría sólo a un grupo de clones. El contenido final de células  $\text{IgA}^+$  e  $\text{IgG}^+$  es similar al de los controles en estos pacientes, -- así como la proporción de IgA monomérica sintetizada en respuesta al PWM y sólo se produce un incremento en la proporción que afecta a células cadena J- $\text{IgA}^+$  que serían las representantes de -- parte de esta población anormal. Su comportamiento frente al anti suero anti-cadena J refleja posiblemente este hecho, al obtener -- con una pequeña dosis una respuesta similar a la de células diferenciadas, pero aún no totalmente comprometidas que serían susceptibles de modulación y fallarían al aumentar la dosis debido a su alto contenido en células no bien diferenciadas para ese determinado isotipo.

La respuesta a un estímulo policlonal "in vitro" no es consecuencia sólo de la actividad de los linfocitos B, sino de un elaborado sistema de interacciones celulares que potencian y -- limitan el desarrollo de una respuesta final (36). El aumento específico para la síntesis de IgA en estos pacientes puede representar a priori una anomalía en la función de los linfocitos B, como puede desprenderse de los comentarios anteriores, ó bien de los -- linfocitos T, cuya participación activa es necesaria para la respuesta frente al PWM.

Nuestras experiencias demuestran que los pacientes con nefropatía de IgA, estudiados por anticuerpos monoclonales anti-células T, presentan en sangre periférica unos porcentajes de -- linfocitos T totales OKT-3<sup>+</sup> normales y un aumento en el índice de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup>, debido a la prevalencia relativa de la población de T cooperadores OKT-4<sup>+</sup> sobre la población supresora OKT-8<sup>+</sup>. Compatible con estas alteraciones, está la profunda modificación -- que hemos observado en la actividad supresora de la síntesis de -- IgA, acompañada de una rápida diferenciación de células supresoras inducidas por la Con A, con relación a la situación control. Bajas concentraciones de lectina inducen una fuerte supresión de la síntesis de IgA acompañada de una rápida diferenciación de células supresoras OKT-8<sup>+</sup>. En el 50% de los controles no aparece es

te efecto. Se produce una estimulación de la síntesis manteniendo prácticamente todos los casos estudiados, una elevada proporción de células cooperadoras en el medio. Este comportamiento confirma la hipótesis de un efecto cooperador ó supresor sobre la síntesis de inmunoglobulinas en dependencia de las proporciones de células cooperadoras ó supresoras presentes en el cultivo (119, 156'). El mantenimiento e incluso la disminución de los porcentajes de supresión a altas dosis y la similitud en el comportamiento de los cultivos mixtos en las mismas condiciones, frente a la fuerte supresión experimentada por los controles en todas las experiencias hablan en favor de una cierta alteración en la generación de supresores más que de una "incapacidad" de la población responsable para el ejercicio de la función supresora. Esta hipótesis se ve apoyada por las variaciones que observamos en las proporciones relativas de células OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> para cada una de las experiencias comentadas. Una vez que se ha producido la aparición de supresores y la reducción en los niveles de cooperadores en respuesta a la - Con A, su generación posterior se independiza de la dosis, manteniéndose casi inalterados sus niveles en el medio. Esto determina una profunda alteración en las proporciones de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> en el cultivo.

Otro punto interesante es el hecho de que nuestro - pacientes presenten un aumento en la suma de los porcentajes de - células con características T supresoras y T cooperadoras con relación al número de células totales OKT-3<sup>+</sup>. Esta diferencia puede ser debida a un fallo del anticuerpo monoclonal específico, con - una detección menor células T con relación a las presentes. Sin - embargo aunque estadísticamente no fue significativo, se detectó - en 4 de los 8 pacientes en los que se estudió la expresión simultánea de ambos marcadores OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> sobre la superficie de - los linfocitos, con un porcentaje entre un 7 y un 10% cuando en con - troles ninguno era superior a un 6%. Estos resultados eran simila - res a los encontrados por otros autores (6) en otras enfermedades como la glomerulonefritis membranosa, la misma nefropatía de IgA, la miastenia graves y otras enfermedades sistémicas, asociados a=



una liberación anormal de células T inmaduras, que unos casos son incapaces de alcanzar los últimos estadios de diferenciación. Aunque son necesarios estudios más profundos sobre este punto, es muy posible que paralelamente ó a consecuencia de las alteraciones inmunológicas producidas por cualquier desorden patológico en general, se produce la expresión simultánea de ambos marcadores sobre algunas poblaciones de células T, representando un paso intermedio en la diferenciación de poblaciones con una u otra característica funcional.

El control de la respuesta a un estímulo policlonal requiere la participación primaria de células cooperadoras, cuyas señales inducen de forma secundaria la activación de los linfocitos B (36). En ausencia de células supresoras, la respuesta mitogénica es muy pequeña y esta condicionada por la mayor ó menor capacidad de las células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup> para diferenciarse en células supresoras OKT-8<sup>+</sup> (145). Este comportamiento no es bidireccional en condiciones normales; no habiéndose observado hasta el momento en células OKT-8<sup>+</sup>. Así, el aumento de células cooperadoras presentado por nuestros pacientes aún sin estímulo mitogénico habla en favor de la dificultad apuntada para generar supresores y justifica los cambios observados en la actividad supresora de las células T sobre la síntesis de inmunoglobulinas.

Cuando estudiamos la actividad cooperadora de estas células mediante un co-cultivo in vitro de linfocitos T y B, observamos un gran paralelismo con los resultados anteriores. Los linfocitos T de los pacientes con nefropatía de IgA tenían un aumento en su capacidad cooperadora en respuesta a un estímulo policlonal, a la hora de regular la síntesis de inmunoglobulinas en linfocitos B controles. En muchos casos, esta actividad no era intrínseca de los linfocitos T, sino consecuencia de la incapacidad de la célula B para ser regulada, incluso en presencia de linfocitos T normales. Esto junto con el hallazgo no infrecuente de pacientes con una actividad supresora normal para la síntesis de IgA sugiere que la afectación de cooperadoras podría ser la alteración primaria y y las anomalías de supresión, su consecuencia.

La presencia de IC-IgAp y la propia IgA polimérica en el suero de estos pacientes puede contribuir a la perpetuación de las alteraciones celulares hasta ahora comentadas.

Existen varios datos en la literatura sobre el papel modulador de los IC en la actividad de células supresoras in vivo e in vitro (37, 136) y su capacidad para inducir la transformación de células  $T_Y$  en células  $T_\mu$  y la pérdida de su capacidad para inducir la formación de supresores (70). Además, existe una asociación generalizada entre la elevación de los niveles séricos de un isotipo determinado y el aumento en el número de L-T con -- receptores de superficie para la cadena pesada de ese isotipo en mielomas secretores humanos (73) y plasmacitomas secretores experimentales (74). Concretamente, la elevación de los niveles séricos de IgA induce la expansión de una población  $T_\alpha$  no relacionada con el tumor en sí. In vitro, se ha obtenido un efecto similar al incubarlo con IgA polimérica. La expansión y diferenciación de células  $T_\alpha$  requería la interacción con la IgA (75) y la biosíntesis de DNA y proteínas.

Nuestras experiencias de incubación del suero de pacientes con nefropatía de IgA con células control demostraron claramente que el suero inducía un aumento en la síntesis específica de IgA en respuesta al PWM, acompañado de un incremento en el número de células cooperadores presentes en el cultivo. El estudio de la actividad supresora inducida por la Con A en células control tratadas con el suero reveló un comportamiento similar al de las células de los pacientes en las mismas condiciones. Se producía un aumento en la supresión de la síntesis de IgA, acompañada de una estimulación de la síntesis de IgG a bajas dosis de Con A, mientras que existía una falta de supresión específica de IgA cuando la dosis aumentaba. Los niveles de células OKT-4<sup>+</sup> sufrían una reducción con respecto a su situación basal, independizándose de la dosis de lectina utilizada y los de células OKT-8<sup>+</sup> revelaban una incapacidad del sistema para la generación de supresores, con una rápida diferenciación inicial a bajas dosis que no era -- significativa con respecto al basal y una falta de proliferación=

cuando el requerimiento era mayor. Las células de los pacientes - tratadas con sueros control tuvieron el mismo comportamiento.

Estos resultados revelan la participación efectiva - de algunos factores presentes en el suero de los pacientes con ne fropatía de IgA. Estos factores contribuyen a la perpetuación y - potenciación de la lesión primaria que desencadena la serie de su cesos inmunológicos propios de esta enfermedad.

Para determinar si el efecto observado radicaba en - la propia IgA polimérica, sus inmunocomplejos o en ambos a la vez , hicimos un grupo de experiencias de incubación de células con-- trol con IgA monomérica, IgA polimérica e IgG y sus agregados co-- rrespondientes. En contra de lo obtenido en otras situaciones - (5), la presencia de estas proteínas y sus agregados no influyó - en la síntesis de inmunoglobulinas, pero si indujo una fuerte al teración en el comportamiento de las poblaciones implicadas en su regulación, generadas por la Con A. Los agregados de IgG produ--- cían una estimulación general de la síntesis de inmunoglobulinas= en respuesta a la inducción de supresores por la Con A. La IgA mo nomérica no alteraba el comportamiento normal de las células y la IgA polimérica, los agregados de IgA monomérica y de IgA poliméri ca determinaban una falta de supresión a altas dosis de Con A, -- acompañado de un aumento de supresión a bajas dosis, específico - para la síntesis de IgA. Es decir, tanto la IgA polimérica, como= los inmunocomplejos de IgA polimérica o IgG presentes en el suero de estos pacientes pueden ser responsables en parte de las altera ciones propias de la enfermedad.

Es muy posible, que la persistencia de elevados nive les de IgA polimérica en el suero induzca y mantenga la expansión de una población de células T con receptores para la cadena  $\alpha$  .- Los inmunocomplejos de IgA polimérica deben contribuir a modular= la actividad de esta población de la misma forma que puede hacer= lo los de IgG (117), condicionando la pérdida de su capacidad pa= ra formar supresores. Esta sería una situación similar a la que - hemos observado con los agregados de IgG, IgA monomérica e IgA -- polimérica. En el primer caso, según Moretta (117) su presencia -

induce una pérdida de marcadores Y sobre las célula T con características de supresoras globales sobre la síntesis de inmunoglobulinas, que serían incapaces de diferenciarse frente al estímulo mitogénico y controlar la proliferación de cooperadores en respuesta al PWM, que no se afectarían puesto que carecen de este -- marcador. En el segundo y tercer caso, la pérdida selectiva debe-- afectar a un grupo con marcadores  $T_{\alpha}$ , ya que la modificación en -- la generación de supresoras es específica para la síntesis de IgA . Esta hipótesis se ve apoyada por incremento en el número de células con ambos marcadores OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup> en su superficie que -- aparece de nuevo en estas experiencias. La pérdida selectiva de -- receptores para los inmunocomplejos de IgA sobre  $T_{\alpha}$  no se apreci-- ría en el conjunto de supresores, pero contribuiría a aumentar la proporción de  $T_{\alpha}$  con características cooperadoras. (28)

La expansión general de cooperadores que aparece en-- todas nuestras experiencias podría ser una exagerada, pero normal respuesta inmunoreguladora que influiría en el crecimiento y regu-- lación de los linfocitos B. No hay que olvidar que en estos pa--- cientes se han detectado inmunocomplejos de IgA polimérica forma-- dos en exceso de anticuerpo e inmunocomplejos de IgG. Ding y Segre (33) demostraron en modelos experimentales, que los inmunocomple-- jos formados en exceso de anticuerpo son capaces de establecer -- reacciones cruzadas con los receptores específicos de linfocitos T , bien directamente o a través del macrófago (50), cuya internali-- zación determina una señal que conduce a la activación de células T cooperadores. La permanencia de elevados niveles de cooperado-- ras aún en ausencia del estímulo en los pacientes con nefropatía-- de IgA puede ser una manifestación de estas interacciones y la -- IgA polimérica, el exceso de anticuerpo necesario. Esto se vería -- apoyado por las diferencias que hemos observado al incubar con -- IgA monomérica e IgA polimérica en respuesta a la Con A. El efec-- to es tanto más acusado cuanto mayor es el número de reacciones -- cruzadas que puede establecer el elemento bloqueante (polímero -- frente al monómero).

Aunque la mayoría de los estudios sobre inmunoregulación en diversas enfermedades, principalmente de origen autoinmune, están dedicados a las anomalías de células T (49), particularmente a la deficiencia selectiva de T supresores, la afectación -- alternativa y no mutuamente excluyente de células T cooperadoras -- con un aumento en su función, está siendo considerada. De hecho, = varios estudios en modelos animales de Lupus Eritematoso sugieren esta posibilidad (49). Esto estaría de acuerdo con la hipótesis -- de un defecto más profundo y primitivo de las células precursoras resultando en la hiperactividad de algunos clones de células B. -- Consecuencia directa sería el incremento de células cooperadoras -- favorecido por los inmunocomplejos en exceso de anticuerpo seguida -- de la pérdida secundaria de células supresoras (49) que contribuiría a perpetuar la alteración. Esto explicaría que algunos de los pacientes con nefropatía de IgA presenten simultáneamente un aumento de la actividad cooperadora y una incapacidad de los linfocitos B para ser regulados normalmente.

La elevada producción de IgA por los linfocitos --- tras su estimulación policlonal in vitro, el aumento en el número de portadores de IgA y de los que contienen cadena J y fijan componente secretorio en su citoplasma abogan por la existencia de -- anomalías intrínsecas en los linfocitos B. Sin embargo, otras enfermedades de tejido conectivo y el mismo lupus eritematoso, caracterizadas por la hiperactividad de los linfocitos B (17), suelen ir acompañadas de hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos -- contra una serie de determinantes propios que no aparecen en la -- nefropatía de IgA. Muy recientemente se ha demostrado la existencia de un factor antinuclear que reacciona en frío, de la clase -- IgM en gran parte de estos pacientes, sugiriendo que algunos mecanismos autoinmunes podrían intervenir en el desarrollo de esta nefropatía (125).

Tanto si la anomalía primaria residiera en las células B, T cooperadoras ó en ambas a la vez, se podría hipotetizar -- que en algún momento de su evolución estos pacientes tendrían un aumento en la diferenciación de linfocitos T supresores en un in-

-tento de contrapesar la producción excesiva de IgA. Esto estaría seguido de una pérdida secundaria de la capacidad de generar convenientemente nuevas células supresoras que funcionaran adecuadamente. La presencia de inmunocomplejos de IgA polimérica favorece el proceso. De hecho, 7 de los 27 pacientes estudiados y 12 de sus familiares mostraron un aumento en el número de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> en ausencia de estímulo policlonal alguno.

Nuestros hallazgos plantean la cuestión del posible papel del desbalance de células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> en el desarrollo y perpetuación de la nefropatía. La mayoría de los pacientes estudiados presentaban función renal normal ó discretamente disminuida y no pudo establecerse ninguna correlación entre los estudios inmunológicos y la severidad de la enfermedad. Ahora bien, es posible que siguiendo a una infección viral exista una disminución transitoria de la actividad supresora que podría conducir a un aumento de la síntesis de IgA favoreciendo en individuos susceptibles la diferenciación de linfocitos B en este sentido y probablemente de IgG y a una subsiguiente formación de inmunocomplejos como se ha descrito durante los episodios de hematuria macroscópica en la nefropatía de IgA (153). Recientemente nuestro grupo encontró una correlación entre los niveles de IgA polimérica y la existencia de inmunocomplejos de IgA polimérica (193). Los estudios longitudinales de los distintos subgrupos de linfocitos T en los mismos pacientes a lo largo del tiempo podrían ayudarnos a comprender si las alteraciones descritas en este trabajo están directamente relacionadas con anomalías genéticas de la nefropatía, más que una expresión secundaria de defectos primarios.

Teniendo en cuenta la existencia de nefropatía de IgA de carácter familiar y la asociación ocasional de esta nefritis con determinados antígenos del sistema HLA (45), el estudio de los familiares próximos de estos pacientes constituía un grupo interesante para seguir la aparición cronológica de las anomalías inmunológicas, tal como ocurre en los pacientes lúpicos (155). Ya se ha comentado que en algunos parientes otros autores habían encontrado un aumento en el número de los linfocitos periféricos por

tadores de IgA y un factor antinuclear que reaccionaba en frío. -- En este sentido, las siete familias estudiadas en este trabajo -- aportan datos muy interesantes.

En todos los casos, al menos uno de los padres presentaban e incluso compartían varias alteraciones de las comentadas. Curiosamente en una de las familias con dos miembros afectados (padre e hijo), la madre tenía un aumento en sus niveles séricos de IgA polimérica, con una producción normal en su respuesta al PWM y una proporción mayor de IgA polimérica. Las proporciones de de sus células OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup> eran normales.. Había supresión a altas dosis de Con A, pero se producía una fuerte supresión a concentraciones mayores que no se correspondía con el comportamiento de los controles. Analizando el resto de los miembros de la familia (dos hijos varones) observamos un aumento en la producción in vitro de la fracción polimérica y una muy ligera dificultad para generar supresores a altas dosis y una total incapacidad a dosis menores. El número de células con capacidad para unir componente secretorio era muy alta y presentaban simultaneamente un aumento en el número de células OKT-4<sup>+</sup> y OKT-8<sup>+</sup>, con un índice normal OKT-4<sup>+</sup>/OKT-8<sup>+</sup>. Este defecto se observó en el 50% de los familiares. El aumento de la fracción polimérica sérica apareció en el 30%, acompañada en un 85%, de un aumento en la síntesis in vitro de esta fracción. La supresión a altas dosis de Con A era normal, pero fallaba la regulación a concentraciones menores, produciendo una -- fuerte supresión con una prevalencia de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>. Esto, el aumento en el número de células con capacidad para unir el componente secretorio y el aumento en el número de células portadoras de IgA está a favor de que junto a los genes del HLA ó independientemente de ellos, otros genes controlando la respuesta independiente del antígeno sean necesarios para la aparición de la enfermedad. En este sentido, los hallazgos en los pacientes y sus familiares estarían en línea con la nueva teoría a cerca de la genética de algunas enfermedades inmunológicas, como es el caso del lupus (155). Según esta teoría, existirían dos grupos de genes. Un grupo controlaría la función de las células T cooperado

ras y supresoras y el sistema HLA y otro grupo codificaría la rama eferente del sistema inmune: clases de inmunoglobulinas, formación de inmunocomplejos y respuesta inflamatoria. Aunque no está claro si esta teoría podría ser aplicable a la nefropatía de IgA es interesante comentar que ninguno de los familiares que presentaron trastornos de inmunoregulación (primer grupo de genes) tenían inmunocomplejos (segundo grupo de genes). Se ha observado un riesgo relativo en el desarrollo de esta nefropatía asociado a la presencia de antígenos de células B identificados por aloantisueños L y B (53), que no parecen relacionados con la región HLA-DR. Estudios más amplios en familias permitirían un conocimiento más profundo de los aspectos inmunogenéticos que podrían estar implicados en el desarrollo de esta enfermedad.

Tras el análisis detallado de los resultados aportados por este trabajo y de las características clínicas e histopatológicas de la nefropatía de IgA, proponemos la siguiente hipótesis para explicar su desarrollo y perpetuación como tal entidad:

" La alteración inmunológica y la afectación renal propias de esta enfermedad podrían tener su origen en una infección viral ó de otro tipo que en ciertos individuos genéticamente susceptibles determinaría una diferenciación de células precursoras para la respuesta de IgA. La caída de supresión transitoria y el incremento normal en los niveles séricos de IgA polimérica e inmunocomplejos de IgA y probablemente de IgG y su acción sobre la diferenciación de ciertos clones de linfocitos B con una alta susceptibilidad para la respuesta de IgA. Una vez controlada la infección la hiperactividad de estas poblaciones y el lento aclaramiento de la IgA polimérica en forma de inmunocomplejos por el sistema reticuloendotelial y el hígado crearían el ambiente adecuado para su perpetuación. Estos clones serían incapaces de alcanzar estadios de diferenciación tardíos y dar en condiciones normales una respuesta generalizada a un estímulo antigénico.

La diferenciación de células supresoras para este isotipo que iría paralela a la desaparición del estímulo antigénico,



se vería muy dificultada. Las células hiperestimuladas por las condiciones del medio responderían rápidamente ante pequeños estímulos pero fallarían cuando los requerimientos antigénicos fuesen mayores debido a un agotamiento secundario del mecanismo regulador. La actividad de las células cooperadoras no estaría controlada, permitiendo su libre proliferación y el mantenimiento de los elevados niveles de producción de IgA polimérica en estos pacientes.

Los niveles de inmunocomplejos de IgA polimérica circulantes y su tamaño determinarían su depósito en el mesangio renal y la aparición de las lesiones clínicas e histológicas propias de la enfermedad.

El fallo del fino mecanismo regulador de la síntesis de IgA determinaría un reajuste global del sistema inmune para mantener su funcionamiento dentro de unos márgenes de respuesta aceptables. Esto se traduciría en el aumento global de células T reguladoras y la estimulación de la síntesis de IgG e IgM a ciertas concentraciones mitogénicas. De aquí, que la mayoría de los pacientes con nefropatía de IgA no tengan ninguna alteración clínica que --evidencie la existencia de la enfermedad.

172'

# CONCLU- SIONES



## 6.- CONCLUSIONES

- 1.- Los pacientes con nefropatía de IgA presentan "in vitro" un aumento específico de la síntesis de IgA en respuesta a la estimulación policlonal de mitógeno Pockeweed (PWM).
- 2.- El análisis cualitativo reveló que la IgA sintetizada en res--puesta al PWM tenía características bioquímicas de verdaderas moléculas poliméricas. Su proporción era sensiblemente mayor,--que la sintetizada por los controles en las mismas condiciones.
- 3.- Este aumento en la proporción de IgA polimérica iba acompaña--do de un aumento en los prcentajes de células sintetizadoras=de IgA con capacidad para unir componente secretorio y en el= número de células portadoras de esta inmunoglobulina en su su=perficie.
- 4.- La respuesta para la síntesis de IgA esta condicionada por un defecto en la diferenciación de algunos clones implicados en --la síntesis de IgA. Estos pacientes exhiben una proporción ma=mayor de células conteniendo cadena J, antes y después de su es=timulación policlonal. Pero mientras la proporción de células=sintetizadoras de IgG e IgM con este marcador disminuye en --respuesta al mitógeno, la IgA permanece aumentada. La cantidad total de células sintetizadoras de IgA, IgG e IgM antes y des=pués de la estimulación policlonal es similar a la de los con=troles.
- 5.- La presencia de un suero anticadena J humana en un cultivo de células mononucleares obtenidas de sangre periférica de suje=tos control determina una modificación de la síntesis de inmu=noglobulinas en función del grado de diferenciación de las po=blaciones celulares implicadas en su biosíntesis.
- 6.- El drástico cambio en la síntesis de IgA e IgM in vitro en --

presencia de un suero anticadena J humana experimentada por los pacientes con nefropatía de IgA sugiere una incapacidad por parte de algunos clones celulares implicados en la síntesis de este isotipo para alcanzar estadios de diferenciación tardíos y dar una respuesta generalizada normal a la activación policlonal.

- 7.- Los pacientes con nefropatía de IgA manifiestan una relativa prevalencia de células T cooperadoras OKT-4<sup>+</sup> sobre las células T supresoras OKT-8<sup>+</sup>, con unos niveles normales de células T totales OKT-3<sup>+</sup>.
- 8.- Esta predominancia va acompañada de un aumento en la actividad cooperadora de los linfocitos T específica para la síntesis de IgA en respuesta al PWM. En algunos casos, el incremento de esta actividad es consecuencia de una incapacidad de la célula B para ser regulada ó de la expresión de ambos defectos a la vez.
- 9.- Los pacientes con nefropatía de IgA manifiestan un trastorno específico en el comportamiento de las células supresoras inducidas por la Con A, para la síntesis de IgA, que va acompañado de una estimulación de la síntesis de IgG e IgM a ciertas dosis mitogénicas. Esta alteración es consecuencia de un defecto primario en la diferenciación y actividad de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>, con una pérdida secundaria de la capacidad generadora de células supresoras OKT-8<sup>+</sup> en respuesta a la Con A.
- 10.- El suero de los pacientes con esta enfermedad produce un incremento específico de la síntesis de IgA en cultivos de linfocitos control estimulados con PWM. Este efecto va acompañado de un aumento en la proporción de células cooperadoras OKT-4<sup>+</sup>. Su presencia induce un fallo en la generación de células supresoras OKT-8<sup>+</sup>, con una profunda alteración de la propor-

ciones de células reguladoras en respuesta a la Con A. Experiencias paralelas demostraron que tanto la IgA polimérica -- aislada de mielomas de IgA, como los agregados de esta inmunoglobulina y de IgG, producían una fuerte alteración de la actividad supresora, en la misma situación. Estos resultados son compatibles con la existencia de ciertos factores (IgA polimérica, inmunocomplejos de IgA polimérica y de IgG) en el suero de estos pacientes que contribuyen al desarrollo y perpetuación de las alteraciones inmunológicas propias de esta enfermedad.

11.- El estudio de los familiares próximos a los pacientes con nefropatía de IgA reveló la existencia de un porcentaje variable de alteraciones inmunológicas, según los aspectos estudiados. Entre estos destacan: la síntesis aumentada de IgA polimérica, la existencia de un incremento en el número de linfocitos T cooperadores OKT-4<sup>+</sup> y T supresores OKT-8<sup>+</sup> y un fallo generalizado de la actividad supresora inducida por dosis de Con A inferiores a 10 µg/ml.

12.- La falta de inmunocomplejos de IgA e IgG en los familiares con trastornos de inmunoregulación y la transmisión vertical de las alteraciones nos sugiere la existencia de algún otro factor desconocido, junto a una cierta susceptibilidad genética, asociada o independiente de la expresión de los genes del HLA, para el desarrollo de la nefropatía de IgA.

175'

1752

# BIBLIO- GRAFÍA



7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abney E.R. Cooper D.D. Kearney J.F. Lawton A.R. y Parkhouse - R.M.E. (1978): J. Immunol. 120, 2041.
- 2.- Adolfini M. Glynn A.A. Lindsay S. Milne C.M. (1966): Immunology 10, 517.
- 3.- Alarcón-Segovia D. y Ruiz Arguelles A. (1978): J.Clin. Invest 62, 1360.
- 4.- Andre C. Berthoux F.C. Andre F. Guillon J. Genin C. y Sabatier J. Ch. (1980): N. Engl. J. Med. 303, 1743.
- 5.- Ashmann R.F. y Weisenhutter C. (1981): Clin. Reserch. 29, 2.
- 6.- Bach M.A. y Bach J.F. (1981): Clin. Exp. Immunol. 45, 449.
- 7.- Bankhurst A.A. (1978): J. Lab. Clin. Med. 91, 15.
- 8.- Benveniste J. y Bruneau C. (1979): J. Immunol. Methods 26, 99
- 9.- Bene M.C. Faure G. Duheille J. (1980): IV Int. Cong. Immunol. Abs 18.5.06. París
- 10.- Berger J. (1969): Transplant Proc. 1, 939.
- 11.- Berger J. Yaneva H. Nabarra B. y Barbanel C. (1975): 7, 232.
- 13.- Berger J. Yaneva H. Nabarra B. Crosnier J. (1980): Nouv. --- Press. Med. 9, 219.
- 12.- Beger J. Yaneva H. Nabarra B. (1978): Adv. Nephrol. 7, 13.
- 14.- Berrith S. Gaud S. Bach M.A. Kung P. Goldstein G. (1981): -- Clin. Exp. Immunol. 45, 1.
- 15.- Berthoux F.C. Gagne A. Sabatier J.C. Dueret F. Le petit J.C. Marcelin M. Mercier M Brizard C.P. (1978): N. Engl. J. Med. = 298, 1034.
- 16.- Boyüm A.S. (1968): Clin. Lab. Invest. (suppl) 21, 51.
- 17.- Brandtzaeg P. (1973): Nature 243, 142.
- 18.- Brandtzaeg P. (1974): Adv. Exp. Med. Biol. 45, 87.
- 19.- Brandtzaeg P. (1976): Clin. Exp. Immunol. 25, 59.
- 20.- Brandtzaeg P. (1978): Scand. J. Immunol. 8, 39
- 21.- Brandtzaeg P. Geruldsen S.T. Korsrud F. Baklien K, Berdal P. (1979): J. Immunol. 122, 503.
- 22.- Brandtzaeg P. (1981): Clin. Exp. Immunol. 44, 221.
- 23.- Burrows P. Le Jeune M. y Kearney F.F. (1979): Nature (Lond)=

- 24.- Butler J.E. (1979): Seminars Perinatology 3, 255.
- 25.- Cebra J.J. Edmons R. Garhart P.J. Robertson S.M. Tsang J. (1978): In secretory immunity and infection (J. Mestecky J.R. Mc. Ghee J.L. Babbs Eds.) Plenum Press N.Y.
- 26.- Conley M.E. Cooper M.D. Michael A.F. (1980): J. Clin. Invest 66, 1432.
- 27.- Coppo R. De Marchi M. Aprotto A. Recattello D. Messina M. Segalone G. Camussi G. Alloatti S. Giachino F. Carbonera A.O. = Berzellone A. Piceoli G. (1980): Proc. Eur. Dial. Transp. As 17, 667.
- 28.- Cooper M.D. Kubagawa H. Vogler B. Kearney J.F. Lawton A.R. — (1978): In Secretory Immunity and Infection (J.R. Mc Ghee J. Mestecky L. Babbs eds.) Plenum Press, New York N.Y.
- 29.- Crago S.S. Kuhavy R. Prince S.J. y Mestecky J. (1978): J. -- Exp. Immunol. 147, 1832.
- 30.- Crago S.S. y Mestecky J. (1979): J. Immunol 122, 906.
- 31.- Cunningham-Rundless C. Brandeis W.E. Good R.A. Day N.K. (1979) J. Clin. Invest. 64, 272.
- 32.- Demman A.M. (1978): Brith. Med. J. 980, 982.
- 33.- Ding D.H. Segre M. y Segre K. (1979): Cell Immunol 46, 272.
- 34.- Dobrin R.S. Kundson F.E. Michael A.F. (1975): Clin. Exp. Immunol 21, 318
- 35.- Droz D. (1976): Contr. Nephrol. 2, 150.
- 36.- Earley D.D. Higenberger J. Vay-Boreau M.C. Shaens F.W. Ger-- show R.S. Cantor H. (1978): J. Exp. Immunol. 147, 1106.
- 37.- Egidio J. Sancho J. Mampaso F. Lopez Trascasa M. Sanchez Crespo M. Blasco R. Hernando L. (1980): Proc. Euro. Dial. Trans. 17 660 Ass.
- 38.- Ebersole J. Taubnam M.A. y Smith D.J. (1979): J. Immunol. 123 19.
- 39.- Egidio J. Lopez Trascasa M. Mampaso Sancho J. Hernando L. (1980) 4th Inter. Congr. Immunol. 13.5.09
- 40.- Egidio J. Sanchez Crespo M. Sancho J. y Hernando L. (1981a): = Clin. Nephrol. 15, 164.
- 41.- Egidio J. Rivera F. Sancho J. Moreno M. Kriesler M. y Hernan-

- do (1981): Nephrologia 1, 21.
- 42.- Egido J. Sancho J. Lopez Trascasa M. Sanchez Crespo M. Rivera F. Alvarez V. Barat P. y Hernando L. (1981B): Immunological Asp. Rev. Dis. ( in press).
  - 43.- Egido F. Sancho J. Rivera F. y Hernando L. (1981): Immunology (in press)
  - 44.- Egido F. Sancho J. Rivera F. y Hernando L. (1982): (en preparación)
  - 45.- Egido J. Sancho J. Blasco R. y Hernando L. (1981): In advances in nephrology. Vol II (Hamburger, Chrosnier, Günfield, Maxwell Eds) Year Book Chicago (to be published)
  - 46.- Elson C.O., Heek J.A. Strober O. (1979): J. Exp. Med. 149, -- 632.
  - 47.- Fanger M.W. Shau L. Pugh J. Bernier G.M. (1980): P.N.A.S. (-USA) (1980): 77, 3640.
  - 48.- Fauci A.S. (1980): J. All. Clin. Immunol. 66, 5.
  - 49.- Fauci A.S. Stenberg A.D. Haynes B.F. Wholens G.J. (1978): J. Immunol. 121, 897.
  - 50.- Feldmann M. y Kotianen S. (1976): Eur. J. Immunol. 6, 302.
  - 51.- Finkelmann F.D. Lupsy P.E. (1978): J. Immunol. 120, 1465.
  - 52.- Freizi T. (1968): Gut 9, 193.
  - 53.- Friend P.S. Yunis E.J. Noreen H.J. Reinsmøen N. Dubey D. -- Mickael A.F. (1979): J. Immunol. 123, 2182.
  - 54.- Galili V. Schlesinger M, (1974): J. Immunol. 112, 420.
  - 55.- Garcia Pardo A. Lamm M.E. Plantt A.G. y Frangione B. (1979): Molec. Immunol. 16, 477.
  - 56.- Gaurilova E.M. Egorov A.M. Shalanina K.O. (1976): Biokhimuya 42, (1) 129.
  - 57.- Gearhart P.J. y Cebra J.J. (1979): J. Exp. Med. 149, 216.
  - 58.- Germuth F.G. Rodriguez E. Siddifuis Y. Lorelle C.A. Mc Ghee J. Milano W.L. Wise C. (1978): Lab. Invest. 38, 404.
  - 59.- Germuth F.G. Rodriguez E. Lorelle C.A. Trump E. Milano L. Wise O. (1979): Lab. Invest. 41, 360
  - 60.- Gorley A.A. Smith P.S. Seymour A.E. Clarkson A.R. Woodroffe A. (1981): Am. J. Pathol. 104, 50.

- 61.- Gotze A.A. Müller-Eberhard H.J. (1971): J. Exp. Med. 134, 90
- 62.- Gromowich E.S. Doss E. Assisi F. Vitteta E.S. Goffman R.L. y Strober S. (1979): J. Immunol. 123, 2049.
- 63.- Hadden J.W. Godfrey F.G. Ananthakrishnan R. y Hadden E.H. -- (1979): N.Y. Acad. Sci. 241
- 64.- Hadsiyans S. Freizi I. Shener P.J. (1969): Clin Exp. Immunol. 5, 499.
- 65.- Hall P.G. Ghyere L.A. Payne W.R. (1980): Immunology 7, 30
- 66.- Hall P.G. (Rev) (1981): Afr. Clin. Exp. Immunol. 2, 195.
- 67.- Hamilton M.E. Windfield J.B. (1979): Arth y Rheum. 22, 1
- 68.- Hara M. Endo Y. Nigei S. Fukushima O. Nimura M. (1980): Arch A. Path. Anat. Hist. 386, 249.
- 69.- Hauptman S.P. Tomassi T.B. Jr (1975): J. Biol. Chem. 250, (10) 3891.
- 70.- Haynes B.F. y Fauci A.S. (1978): J. Immunol. 121, 559
- 71.- Heremans J.F. y Massons P.L. (1973): Clin. Chem. 19, 294
- 72.- Honjo y Kataoka T. (1978): P.N.A.S. (USA): 75, 2142.
- 73.- Hoover R. y Lynch R.G. (1980): J. Immunol 125, 1280.
- 74.- Hoover R. Hickmans S. Gabel H.M. Rabbe M. y Lynch R.G. (1981) J. Clin. Invest. 67, 303.
- 75.- Hoover R.G. Dieckgraefe B.K. Lynch R.G. (1981): J. Immunol. = 127, (4), 1560.
- 76.- Hopf V. Brandtzaeg P. Hutteroth T.H. y Meyer zum Buschenfeld K.H. (1978): Scand J. Immunol. 8, 543.
- 77.- Hotta R. Kusiki y Kakum S (1981): Clin. Exp. Immunol. 46, -- 375.
- 78.- Hugh O. Mc Devitt M.D. (1977): M. Engl. J. Med. 303 (26), -- 1514.
- 79.- Husband A.J. Gowans A.L. (1978): J. Exp. Med. 148, 1146.
- 80.- Hunter A. y Greenwood F.C. (1962): Nature (Lond): 194, 495.
- 81.- Immar F.P. (1978): Adv. Exp. Med. Biol. 45, 167.
- 82.- Issacs K. Miller F. Lane B. (1981): Clin. Immunol. Immunopath 20, 419.
- 83.- Kaartinen M. (1978): Scand J. Immunol. 7, 519.
- 84.- Kaji H. Parkhouse R.M.E. (1974): Nature (Lond): 45, 249.

- 85.- Kaji H. y Parkhouse R.M.E. (1975): J. Immunol. 114, 1218.
- 86.- Kashwabara H. Shisido Y. Yokoyama T. Miyahima I. (1980): Tissue Antigens 16, 411.
- 87.- Katz H.D. (1977): "In lymphocyte differentiation, recognition and regulation" Acad. Press (Lond).
- 88.- Kaufman R.H. Van Eps L.A. Doha M.R. (1981): J. Immunol. Meth 40, 117.
- 89.- Kruffman R.H. Heremans W.A. Meyer C.J. Doha M.R. Van Eps L.A (1980): Am. J. Meth. 69, 859.
- 90.- Kearney J.F. Klein J. Bockman D.E. Cooper M.D. y Lawton A.R. (1978): J. Immunol. 120, 158.
- 91.- Komori K. Nose L. Inonye H. Tsuyi K. Nomoto Y. Sakay H. (1979) Tissue Antigens 14, 32.
- 92.- Kuttet W.H. Hoopman W.J. Conley W.E. Egan M.L. y Mestecky J. (1980): J. Exp. Med. 152, 1424.
- 93.- Lagrue G. Branellee A. Intrator L. Moisy M. Sobel A. (1979): Nouv. Press. Med. 8, 1153.
- 94.- Lake A.M. Blöch K.J. Neutra M.R. Walker W.A. (1979): J. Immunol 122, 834.
- 95.- Lally E.T. Zitron I.M. Fiorini R.C. y Montgomery P.L. (1978) In "Secretory immunity and infection" (J.R. Mc Ghee J. Mestecky J.L. Babbs eds.) Plenum Press, New York N.Y.
- 96.- Lamaitre-Coelho I. Jackson G.D.F. y Vaerman J.P. (1977): Eur J. Immunol. 3, 588.
- 97.- Lamm M.E. (1976): Adv. Immunol. 22, 223.
- 98.- Lawley Y.H. Hall R.P. Fauci A.S. Datz S.I. Hamburger M.I. -- Frank M.M. (1981): N. Engl. J. Med. 304, 185.
- 99.- Layton J.E. Pike B.L. Battye C. y Nossal G.J. (1979a): J. Immunol. 123, 702.
- 100.- Layton J.E. Teales J.M. Nossal G.J. (1979b): J. Immunol. -- 123, 709.
- 101.- Lopez Trascasa M. Egido J. Sancho J. Hernando L. (1979): -- Clin. Exp. Immunol. 42, 247.
- 102.- Lopez Trascasa M. Egido J. Sancho J. Hernando L. (1979): Proc. Eur. Dial TRans. Ass. 16, 513.

- 102.- Mauer S.M. Sutherland R.J. Howard A.L. Fisher J.S. Najarian J.S. Michael A.F. (1973): J. Exp. Med. 137, 553.
- 103.- May-Hoffer G. Fisher R. (1979): Eur. J. Immunol. 9, 85.
- 104.- Mc Coy R.D. Abranosky C.R. Fisher C.C. (1974): AM. J. Path 76, 123.
- 105.- Mc Cune J.M. Fu S.M. y Kunkel H.G. (1981): J. Exp. Med. 154 138.
- 106.- Mc Dermott M.R. y Bienenstock J. (1979): J. Immunol. 122, - 1892.
- 107.- Mc Donald I.M. Bumble L.J. Kincaid S.P.S. (1980): IV Int. - Cong. Immunol. Abs. 8.5.36. (Paris)
- 108.- Mestecky J. (1976): La Ricerca 6 (suppl) 37.
- 109.- Mestecky J. Winchester R.J. Hoffman T y Kunkel H.G. (1977): J. Exp. Med. 145, 760.
- 110.- Mestecky J. Prud'Homme J.L. Grago S.S. Mihaesco E. Preholl= J.T. y Okos A.J. (1980): Clin. Exp. Immunol 39, 371
- 111.- Metzger H. (1979): Ann. Rev. Pharm. 19, 427
- 112.- Michael A.F. Keane W.F. Raji L. Wernier R.L. Mauer S.M. --- (1980): Kidney Inter. 17, 141.
- 113.- Miller K.B. Schwartz R.S. (1979): N. Engl. J. Med. 301, 803
- 114.- Miller J.F. A.P. (1979): Seminars in Haematology 16 (4), 283
- 115.- Mitsuya S. Tomino S. Hisanitsu J. Kishimoto S. (1979): J. - Clin. Lab. Immunol. 2, 337.
- 116.- Moretta L. Webb S.R. Carlo E.G. Lydyard P.M. y Cooper M.D.= (1977): J. Exp. Med. 146, 184.
- 117.- Moretta L. Munigeni M.C. Moretta A. y Romanse C.A. (1979): Biomedicine 30, 4
- 118.- Moretta L. Mingori M.C. Moretta A. y Cooper M.D. (1979): J. Immunol. 122, 984
- 119.- Moretta L. Mingori M.C. Moretta A. Haynes B.F. y Fauci A.S. (1980): Immunology 80' (eds M. Fougereau y J. Dausset) Acad Press London
- 120.- Moussat T. y Baumal R. (1975): J. Immunol. 115, 955
- 121.- Murkosky N.A. y Lamm M.E. (1979): J. Biol. Chem. 254 12181.
- 122.- Nagura H. Nakane P.K. Brown W.R. (1979): J. Immunol. 123, - 2359.

- 123.- Nagura H. Brandtzaeg P. Nakane P.K. Brown W.R. (1979): J. Immunol. 123, 1044.
- 124.- Navas-Palacios J.J. Gutierrez-Millet V. Usera-Sarraga G. - Garzon-Martin A. (1981): Ultrastructural Pathol. 2, 151
- 125.- Nies K.M. Stevens R.H. Lovie J.S. (1981): Clin. Immunol Immunopath. 19, 118.
- 126.- Nomoto Y. Sakai H. Arimori S. (1979): Am. J. Clin. Pathol. = 71, 158.
- 127.- Nomoto Y. Sakai H. (1979): J. Lab. Clin. Med. 94, 76.
- 128.- Nomoto Y. Evidoh M. Tomino Y. Sakai H. (1981): VIII Int. -- Congr. of Nephrol. Athens Abs. C.N. 091 (June).
- 129.- Ogra P.L. Coppola P.R. Mc Hillivray M.H. Dzierda J.L. (1974) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 811.
- 130.- Orlans E. Peppard J. Reynolds J. y Hall J.G. (1978): J. Exp Med. 147, 588.
- 131.- Orlans E. Peppard J. Fry J.F. Hinton R.H. y Müllock B.M. - (1979): J. Exp. Med. 150, 1577.
- 132.- Ouchterlony O. (1942): Act. Path. Microb. Scand. 25, 186.
- 133.- Parker C.W. (1979): Ann. N.Y. Acad. Sci. 255.
- 134.- Peppard J. Orleans E. Payne A.W.R., Andrew E. (1981): Immunology 42, 83.
- 135.- Petterson J. Sober H. (1962): Methods Enzimology 3.
- 136.- Picheler W.J. Lum J. Broder S.F. (1978): J. Immunol. 121, 1540.
- 137.- Pierce N.F. y Koster F.T. (1979): In Immunology of Breast - Milk" (P.L. Ogra y D.H. Dayton eds) Raven Press New York N.Y
- 138.- Plant A.G. (1978): N. Engl. J. Med. 298, 1459.
- 139.- Pryjma J. Munoz J. Virella G. Fudenberg H.H. (1980): Cell - Immunol. 50, 115
- 140.- Radl J. Schumdt J.R.E. Mestecky J. y Hijmans W. (1974): Adv Exp. Med. Biol. 45, 57
- 141.- Reinherz E.L. Kung P.G. Goldstein G. Schlossman S.F. (1979a) J. Immunol. 123, 1312
- 142.- Reinherz E.L. Kung P.G. Goldstein G. Schlossman S.F. (1979b) J. Immunol. 123, 289.

- 143.- Reinherz E.L. Kung P.G. Goldstein G. Leavey R.H. Schlossman S.F. (1980a): P.N.A.S. (USA) 77, 1588
- 144.- Reinherz E.L. Kung P.G. Goldstein G. y Schlossman S.F. --- (1980b): J. Immunol 124, 1301
- 145.- Reinherz E.L. Kung P.G. Bread J.M. Goldstein G. Schlossman S.F. (1980c): J. Immunol. 124, 1883.
- 146.- Reinherz E.L. Moretta L. Roper M. Bread J.M., Mingori M.C. = Cooper M.D. Schlossman S.F. (1980d): J. Immunol. 151, 969.
- 147.- Richman A.V. Mahoney J.J. Fuller T.F. (1979): Ann. Intern. = Med. 90, 201
- 148.- Rifai A. Small P.A. Perry J. Teagne O. y Ayomb E.M. (1979) = J. Exp. Med. 150, 1161.
- 149.- Roitt I.M. (1977): In "Essential Immunology (3<sup>rd</sup> Oxford) -- Blackwell
- 150.- Roolants G.E. (1977): In "B and T cells in immune recogni-- tion" (Ed. F. Loo) Willey.
- 151.- Roux M.E. Mc Williams M. Phillips-Guagliatta J.M. Weisz-Ca-- rrrington P. y Lamm M.E. (1977): J. Exp. Med. 146, 1311.
- 152.- Roux M.E. Mc Williams M. Phillips-Guagliatta J.M. y Lamm M. E. (1980): J. Exp. Med. 135, 1260.
- 153.- Sabatier J.C. Genin C. Assenot G. Colòn S. Dueret F. Ber--- thoux F.C. (1979): Clin Nephrol. 11, 35
- 154.- Sakai H. Nomoto Y. Arimori S. (1979): Clin. Exp. Immunol. -- 38, 243
- 155.- Sakai H. Nomoto Y. Arimori S. Komorik K, Inanye H. Tsuji K. (1979): Am. J. Clin. Path. 72, 452.
- 156.- Sancho J. Egido J. Sanchez Crespo M Blasco R. (1982): Clin. Exp. Immunol. 47,
- 157.- Schumacher K. Wchmer V. Koch W. Schreider W. Loc J. Gross P (1972): Klin. Wochenschr 50, 86.
- 158.- Socken D.Y. Jefferson K.M. Bazin H. Underdown B.J. (1979): = J. Exp. Med. 150. 1538
- 159.- Solling J. Olsen C. (1981): Clin. Nephrol. 16, 63
- 160.- Sprent J. (1978): J. Exp. Immunol. 147, 1159.
- 161.- Stachura I. Singh G. Whiteside D. (1981): Clin. Inn. Immuno



- pathol. 20, 373.
- 162.- Strober W. Magne N.E. Lum L.G. Henkert P.A. (1978): J. Immunol. 121, 2440.
- 163.- Su Minh H. Peu Ling H. (1980): Gut 21, 985.
- 164.- Tomassi T.B. y Zigelberg S. (1963): J. Clin. Invest. 42, -- 1552.
- 165.- Tomassi T.B. y Grey H.M. (1972): Prog. Allergy 16, 817.
- 166.- Tomino Y. (1980): J. Exp. Clin. Med. 5, 15
- 167.- Tomino Y. Endoh M. Nomoto Y. Sakai H. (1981): J. Clin. Pathol 34, 35.
- 168.- Toraño A y Putnan F.W. (1978): P.N.A.S. (USA) 75, 966.
- 169.- Tratmon E.C. (1977): J. Clin. Invest. 59, 117
- 170.- Underdown B.J. Rose J. Pauli A.G. (1977): J. Immunol 118, - 1816.
- 171.- Vaerman J.P. Heremans F.J. Laurell C.B. (1968): Immunology- 14, 425.
- 172.- Vaerman F.P. Heremans J.F. Laurell C.B. (1978): Res. Immunochem. Immunobiol. 3, 91.
- 173.- Van Epps D.E. Williams R.C.J. (1976): J. Exp. Med. 144, 1227
- 174.- Van Epps D.E. Reed K. Williams R.C. (1978): Cell. Immunol. 36, 363.
- 175.- Warrington R.J. Sander P.J. y Rutterford W.J. (1981): Clin. Immunol. and Immunopathol. 19, 372.
- 176.- Wiesz-Carrington P. Roux M.E. Mc Williams M Phillips-Quaglia J.M. Lamm M.E. (1978): P.N.A.S. (USA) 75, 2928.
- 177.- Wiesz-Carrington P. Roux M.E. Williams M. Phillips-Quaglia J.M. Lamm M.E. (1979a): J. Immunol. 123, 1709
- 178.- Wiesz-Carrington P. Roux M.E. Schrelder A.F. Lamm M.E. Thorbeeke G.J. (1979b): Cell Immunol. 44, 343.
- 179.- Werner J. Pichler H. Broder S. (1981): Immunol. Rev. 56, 167
- 180.- Wiggins R.C. Crochranne M.D. (1981): New Engl. J. Med. 304, 91518.
- 181.- Witworth J.A. Leibowitz S. Kennedy M.C. Cameron J.S, Chantler C. (1976): Clin. Nephrol. 5, 33.
- 182.- Wolf H. Fridmann, Robonchrin-Combe C. Newport-Sentes C. Gis

- ler R.H. (1981): Immunol. Rev. 56, 51.
- 183.- Woodland R. Cantor H. (1978): Eur. J. Immunol. 8, 600
- 184.- Woodroffe A.S. Gormley A.A. Mc Kenzie P. E. Wootan A.M. --  
Thompson A.J. Seymour A.E. Clarkson A.R. (1980): Kidney Int  
18, 366.
- 185.- Yamasaki K y Ziffu M. (1977): Arth. and Rheum. 20 (2), 679.
- 186.- Yasuda N. Kanoh T. Vohino H. (1981): Clin. Exp. Immunol 46=  
142.
- 187.- Yap P.L. Pryde A. Latham P.J. Mc Lelland A.B.L. (1979): Act  
Ped. Scand. 68, 695.
- 188.- Zen-Ber I. Vitteta E.S. Assisi F. y Strober S. (1978): J. -  
Exp. Med. 147, 1374.
- 189.- Williams A.F. Fanger T.S. (1969): Immunochemistry 6 , 53

